

Detektion und Klassifizierung von Bewegungsartefakten in der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)



**FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA**

vorgelegt dem Rat der
Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M.Sc. Ronny Förster
geboren am 11. Februar 1989 in Gera

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Heintzmann, IPC, FSU Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Deckert, IPC, FSU Jena

Tag der Verteidigung: 17. August 2018

Vorbemerkung

Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) ist ein außerordentlich interdisziplinäres Themengebiet. Zu den theoretischen Grundlagen, sowie deren numerische Umsetzung in der Bildrekonstruktion, kommt der anspruchsvolle Aufbau des Systems und dessen permanente Justage hinzu. Zusätzlich spielt das Präparieren der Zellen eine erhebliche Rolle für die Qualität der Bilder.

Im Rahmen meiner Masterarbeit entstand ein funktionsfähiger SIM-Prototyp, der im Folgenden stets als „fastSIM“ bezeichnet wird. Darauf aufbauend entstanden mehrere Projekte innerhalb der Arbeitsgruppe biomedizinische Bildgebung die diesen Prototyp nutzen. Für meine persönliche Entwicklung erschien es sinnvoll eine bessere Balance zwischen experimenteller und theoretischer Arbeit zu erreichen. Daher habe ich mich im Rahmen meiner Promotion überwiegend mit der Theorie von SIM auseinandergesetzt. Die hier angefertigte Arbeit ist streng von meiner Masterarbeit getrennt, da ich mich mit Bewegungen - und deren Auswirkung auf das SIM Bild - erst mit dem Beginn meiner Promotion auseinandersetzte. Trotzdem möchte ich sehr explizit darauf hinweisen, dass die auftretenden Publikationen [RF2] und [RF3] vor dem Beginn meiner Promotion entstanden sind.

Einige Abbildungen sind aus meinen eigenen Veröffentlichungen als Erstautor entnommen und dabei stets gekennzeichnet. Die Genehmigung liegt vor (s. Abschnitt B.6). Alle Verweise auf meine eigenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen sind mit dem Kürzel *RF* versehen, um diese hervorzuheben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
Abkürzungsverzeichnis	xi
Symbole und Variablen	xii
1. Meilensteine der Mikroskopie	1
1.1. Mikroskopie am Abbe-Limit	1
1.2. Hochauflösungs-Mikroskopie	3
1.2.1. Zeitliche Trennung - PALM / STORM	3
1.2.2. Räumliche Trennung - Konfokal und STED	3
1.2.3. Modulation der Frequenzen - SIM	4
1.2.4. Vergleich der Methoden für lebende Zellen	4
1.3. Bildartefakte durch Bewegung	5
1.3.1. Aufnahmegeschwindigkeit	5
1.3.2. Abbildbare Prozesse mit SIM	6
1.4. Ziel dieser Arbeit	8
2. Konzepte der Mikroskopie und Bildverarbeitung	9
2.1. Fluoreszenz	9
2.1.1. Jablonski-Diagramm	9
2.2. Die optische Abbildung	11
2.2.1. ATF - Amplituden Transferfunktion	12
2.2.2. APSF - Amplituden Punktspreizfunktion	13
2.2.3. PSF - Punktspreizfunktion	14
2.2.4. OTF - Optische Transferfunktion	15
2.2.5. Rekonstruktion 3-Dimensionaler Daten	16
2.3. Wiener Entfaltung	17
2.4. Abtastung	18
2.5. Rauschprozesse	19
2.5.1. Poisson-Verteilung	19
2.5.2. Gauß-Verteilung	20
2.5.3. Zusammenhang von Poisson- und Gaußverteilung	21
2.5.4. Z-score	21

2.6. Bewegungsdetektion	22
3. Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung	24
3.1. Moiré-Effekt	24
3.2. Bildaufnahme und -rekonstruktion	26
3.2.1. 3-Strahl Interferenz	26
3.2.2. SIM Detektions-OTF	27
3.2.3. Laterale und axiale Abtastung	28
3.2.4. Aufnahme mehrere Phasen	29
3.2.5. Bildrekonstruktion	30
3.2.6. Ideale SIM-Beleuchtung	32
3.2.7. Experimentelle Fehler der SIM-Beleuchtung	32
3.2.8. Auflösungslimit	33
3.3. Bewegungsartefakte	33
3.3.1. Bildaufnahme und -rekonstruktion bewegter Objekte	33
3.3.2. Ort von Bewegungsartefakten	35
3.3.3. Form von Bewegungsartefakten	35
3.3.4. Korrektur von Bewegungsartefakten	36
3.3.5. Bisherige Ansätze	36
3.4. Experimenteller Aufbau	37
4. Der z-score: Ein photonenabhängiges Maß für Bewegung	38
4.1. Generierung unabhängiger Weitfeldbilder	38
4.1.1. Schritt A - Pseudo-Weitfeld Bild	38
4.1.2. Schritt B - Zerlegung in zwei unabhängige Bilder	39
4.2. Schritt C - Unterscheidung von Bewegung und Rauschen	44
4.2.1. Varianzkarte	44
4.2.2. Der z-score	46
4.2.3. Erhöhung des SNR im z-score	48
5. Detektion von Bewegungen an lebenden Zellen	50
5.1. Zweistrahl-SIM	50
5.1.1. BPAE-Zelle	50
5.1.2. Beads	55
5.2. Dreistrahl-SIM	57
5.2.1. Probenpräparation und experimentelle Parameter	57
5.2.2. Bewegung und deren Artefakte	59

5.2.3. Visualisierung der Bewegungsdetektion	61
5.3. Schwachpunkte des z-scores	64
5.4. Simulation einer SIM-Aufnahme mit bewegten Beads	64
5.5. Photonenabhängigkeit des z-scores	66
5.5.1. Theoretisches Verhalten	66
5.5.2. Experimenteller Nachweis	67
6. Bewegungsartefakte in SIM	70
6.1. Artefakte in SIM - Verformung und Scherung	70
6.2. Messung von Artefakten	70
6.3. Zulässige Artefakte und deren Geschwindigkeiten in SIM	71
6.3.1. Verformung - Toleranz Limit	71
6.3.2. Verformung - zulässige Geschwindigkeit	72
6.3.3. Scherung - Toleranz Limit	74
6.3.4. Scherung - zulässige Geschwindigkeit	74
6.3.5. Maximal zulässige Geschwindigkeit	75
7. Der normalisierte z-score: Ein photonenunabhängiges Maß für Bewegung	76
7.1. Normalisierte z-score	76
7.2. Umrechnung: Geschwindigkeit & normalisierter z-score	76
7.3. Notwendiges Signal-Rausch-Verhältnis	77
7.4. Klassifizierung der Artefakte	78
7.5. Übertragung der Schwellwerte auf andere Aufnahmeparameter	81
8. Klassifizierung von Artefakten an lebenden Zellen	83
9. Diskussion	86
A. Wissenschaftlicher Anhang	89
A.1. Diffusion aus dem Bereich der Punktspreizfunktion	89
A.2. Fouriertransformation	89
A.3. Abbe-Limit	91
A.4. Gitterperiode und Phasen in 3D-SIM	93
A.5. Alternative Darstellung der SIM-Ordnungen und SIM Detektions-OTF	94
A.6. Schematische Darstellung der SIM Aufnahmeprozedur	95
A.7. Ideale inverse mixing Matrix	96
A.8. Form von Bewegungsartefakten	97
A.9. SNR der normalisierten z-scores in Abhängigkeit von der Photonenanzahl	98

A.10. Klassifizierung experimenteller Daten	99
Literaturverzeichnis	100
B. Wissenschaftlicher Bildungsgang	107
B.1. Lebenslauf	107
B.2. Publikation	108
B.3. Patentanmeldung	108
B.4. Liste von Postern	108
B.5. Liste von Vorträgen	109
B.6. Genehmigung Teile von [RF2] und [RF5] in dieser Arbeit zu verwenden:	110
C. Danksagung	111
D. Selbstständigkeitserklärung	115

Abbildungsverzeichnis

2.1. Jablonski-Diagramm	9
2.2. Optische Übertragungsfunktion und Impulsantwort	14
2.3. Kontrastübertrag und Tiefpass der optischen Übertragungsfunktionen	17
3.1. Moiré Effekt	25
3.2. Entstehung der SIM-Ordnungen	27
3.3. SIM Detektions-OTF	28
3.4. Vergleich OTF: Weitfeld, 2D-SIM und 3D-SIM	30
3.5. Anisotropie der Auflösungssteigerung in SIM	31
3.6. Experimenteller SIM-Aufbau	37
4.1. Generierung zweier Pseudo-Weitfeld Bilder aus SIM-Rohdaten	41
4.2. Hypothesentest in der Frame Difference Method	47
4.3. Erhöhung des SNR im Differenzbild	49
5.1. Rohbild 2D-SIM einer BPAE-Zelle	51
5.2. Bewegung oder Moiré Effekt in 2D-SIM einer BPAE-Zelle	52
5.3. Anregungsgitter in 2D-SIM einer BPAE-Zelle	52
5.4. Pseudo Weitfeld Bild in 2D-SIM einer BPAE-Zelle	53
5.5. Vergleich zweier Pseudo Weitfeld Bilder in 2D-SIM einer BPAE-Zelle	54
5.6. Homogenen Anregung im Pseudo Weitfeld Bild 2D-SIM einer BPAE-Zelle	54
5.7. Vergleich der Pseudo Weitfeld Bilder verschiedener Gitterrichtungen	55
5.8. Schnelle und grobe Bewegungsdetektion von Beads	56
5.9. Weitfeld Bilder von beweglichen und fixierten Proben	58
5.10. Weitfeld und SIM-Bild eines frei beweglichen Chloroplasts	59
5.11. Nachweis der Bewegung eines freien Chloroplasts	59
5.12. Bewegungsartefakte einzelner Fluorophore in Weitfeld und SIM	60
5.13. Visualisierung der Teilschritte der Bewegungsdetektion	62
5.14. SIM-Bild mit markierten Bewegungsartefakten	63
5.15. Testobjekt zur Bewegungsdetektion	64
5.16. Weitfeld und SIM-Bild des Testobjektes - in Fokus	65
5.17. Weitfeld und SIM-Bild des Testobjektes - außerhalb des Fokus	66
5.18. Abhängigkeit des z-scores von Helligkeit und Geschwindigkeit	68
6.1. Sparrow-Limit als Beispiel für ein toleriertes Artefakt	71
6.2. Deformation am Sparrow-Limit in Abhängigkeit der Fokusposition	72
6.3. Similarity von Beads in Abhängigkeit von Geschwindigkeit und Fokus- position	73
6.4. Similarity von Beads in Fokus in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit	74

7.1. Ultimate normalisierter z-score	77
7.2. Workflow der Klassifizierung	79
7.3. Falschfarbendarstellung der Klassifizierung	81
7.4. Schwellwert DTV als Funktion der Belichtungszeit	82
7.5. Schwellwert DTZ als Funktion der Belichtungszeit	82
8.1. Vergleich: Bewegungsdetektion und Klassifizierung von Bewegungsarte- fakten an lebenden Zellen	83
8.2. Artefact- und Trustmap lebender Zellen	85
A.1. SIM-Ordnungen und Übertragungsfunktionen	94
A.2. Alternative Visualisierung des Moiré Effekts	95
A.3. Trustmap eines freien Chloroplasten	99
A.4. Artefactmap einer fixierten Spaltzelle	99

Tabellenverzeichnis

1.	Geschwindigkeiten von Zellen und Mikroskopen	7
2.	Beispiele gaußsche Fehlerfunktion	23
3.	Gitterperiode und Phasen in 3D-SIM	93
4.	SNR des normalisierten z-scores	98

Abkürzungsverzeichnis

ADU	Analog Digital Einheit (engl.: Unit)
APSF	Amplituden Punktspreizfunktion
ATF	Amplituden Transferfunktion
DIC	Differential Interference Contrast
DTV	Distortion-Threshold-Velocity
DTZ	Distortion-Threshold Normalized z-score
FDM	Frame Difference Method
FT	Fourier-Transformation
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: Full Width at Half Maximum)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IFT	Inverse Fourier-Transformation
NA	Numerische Apertur
NCC	Normalisierte Kreuzkorrelation (engl.: Normalized Cross-Correlation)
OTF	Optische Transferfunktion
PALM	Photoactivated Localization Microscopy
PSF	Punktspreizfunktion
RMS	Quadratisches Mittel (engl.: Root Mean Square)
ROI	Bereich von Interesse (engl.: Region of Interest)
SIM	Structured Illumination Microscopy
SLM	Spatial Light Modulator
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: Signal-to-noise ratio)
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
STV	Shearing-Threshold-Velocity
STZ	Shearing-Threshold Normalized z-score

Symbole und Variablen

$a(\vec{r})$	Amplituden Punktspreizfunktion (APSF)
$\tilde{a}(\vec{k})$	Amplituden Transferfunktion (ATF)
$\delta(\vec{r})$	Kronecker-Delta
\vec{e}_x	Einheitsvektor in Richtung x
$\mathcal{F}(f(x))$	Fouriertransformation von $f(x)$
$\tilde{f}(k)$	Fouriertransformierte von $f(x)$
$h(\vec{r})$	Punktspreizfunktion (PSF)
$\tilde{h}(\vec{k})$	Optische Transferfunktion (OTF)
$\varrho(\vec{r})$	Fluorophordichte der Probe
\hat{X}	Amplitude einer Schwingung X
$ x $	Betrag von x
$\langle x \rangle$	Erwartungswert von x
x^*	Komplex konjugierte von x
\mathbf{X}	Matrix X
\mathbf{X}^{-1}	Invertierte von \mathbf{X}
\otimes	Faltungsoperator
\star	Kreuzkorrelation

1. Meilensteine der Mikroskopie

1.1. Mikroskopie am Abbe-Limit

Der Wellencharakter des Lichtes und der damit verbundenen Beugung führt dazu, dass die Abbildung eines Punktes stets ein verschwommener und unscharfer Punkt ist. Jenes Bild eines Punktes wird als Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet. Ernst Abbe erkannte 1873, dass ein Objekt zwar beliebig *vergrößert* werden kann, dies aber auch mit einer Vergrößerung der PSF einhergeht. Damit immer kleinere Details *aufgelöst* werden können, muss die Airy Scheibe immer kleiner werden. Dies wird durch die Abbesche Auflösungsgrenze beschrieben, welche proportional zur Wellenlänge des Lichtes λ , sowie antiproportional zur numerischen Apertur des Objektivs NA (gebildet aus Öffnungswinkel α und Brechkraft des Mediums n) ist [1]. Der kleinste auflösende Gitterabstand in schräger Beleuchtung in Transmission d_{min} ist nach Abbe:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2NA}$$

Ernst Abbe erkannte, dass „...*die mögliche Höhe der Leistung beim Mikroskop allein in der Konstruktion der Objektive wurzelt und dass keine denkbare Vervollkommenung der Okulare sie im Geringsten beeinflussen kann*“ [1]. Folglich stand die Entwicklung von Objektiven, welche frei von Aberrationen und damit beugungsbegrenzt sind, im Vordergrund. Um die Brechkraft des Mediums und damit die Auflösung zu erhöhen, wurde Wasser als *Immersion* zwischen Probe und Objektiv verwendet. Da die numerische Apertur des Objektivs technische Grenzen hat, kann eine Erhöhung der Auflösung ausschließlich über eine Verringerung der Wellenlänge gelingen [1].

Durch die Entwicklung der Theorie des Wellen-Teilchen-Dualismus, wurde die (de-Broglie-) Wellenlänge von Elektronen entdeckt, welche um Größenordnungen kleiner ist, als die von sichtbaren Licht [2]. Knoll und Ruska bauten 1932 den ersten Prototyp eines Elektronenmikroskops [3]. Heutzutage ist eine Auflösung unter 100 pm möglich, sodass auch atomare Strukturen sichtbar werden [4, 5]. Eine Abbildung *lebender* biologischer Proben ist mit einem Elektronenmikroskop nur in Spezialfällen möglich, da der hochenergetische Elektronenstrahl Moleküle zerstört [6, 7, 8]. Daher hat die Lichtmikroskopie - trotz erheblich schlechterer Auflösung - bis heute nicht an Bedeutung verloren.

Bis zu diesem Zeitpunkt bildeten Mikroskope Absorption und Streuung des Beleuchtungslichtes vom und am Objekt ab, sodass transparente Objekte - insbesondere Zellen - teilweise nur mit sehr geringen Kontrast sichtbar sind. Durch eine Vielzahl von Erwei-

terungen können biologische Proben deutlich besser abgebildet werden. Dazu zählt die Abbildung der Phase (Phasenkontrastmikroskopie), von Kanten (Differential Interference Contrast (DIC)) und optischer Anisotropie (Polarisationsmikroskopie) [9, 10, 11].

Die Entwicklung leistungsfähiger Computer ermöglichte die völlig neue Möglichkeit, die Auflösung eines Bildes nach der Aufnahme zu erhöhen. Hierbei muss die 3D-PSF, mit der ein einzelner Punkt abgebildet wird, bekannt sein. Der Richardson-Lucy-Algorithmus berechnet welches Objekt das gemessene Bild am wahrscheinlichsten erklären kann (*engl.: Maximum Likelihood*) [12, 13]. Eine weitere Möglichkeit ist die Invertierung des mathematischen Prozesses der Abbildung (Entfaltung, *engl.: Deconvolution*), welche von Agard und Sedat erstmals beschrieben wurde [14]. Genannte Algorithmen können zusätzlich am Ende jeglichen Mikroskops verwendet werden. Die mögliche Auflösungssteigerung hängt auch stark vom Objekt ab. Einzelne Punktobjekte können mit deutlich höherer Genauigkeit geschätzt werden als Punktwolken. Die mögliche Auflösungssteigerung steigt mit dem Signal-Rausch-Verhältnis der Abbildung.

Die Beugung des Lichtes verhindert, dass zu dicht beieinanderliegende Punktobjekte im Fernfeld voneinander getrennt werden können. Daher kann Hochauflösung nur dort erreicht werden wo sie noch existent ist - direkt hinter dem Objekt oder im Objekt selbst. Erstes kann mithilfe einer Sonde gelingen, welche wenige Nanometer über der Probe das Licht sammelt. Die mögliche Auflösung liegt deutlich unter dem Abbe Limit. Eine ausgedehnte 3-dimensionale Bildgebung ist nicht möglich, da nur an der Oberfläche die Sonde nah genug am Emitter ist. Zudem limitiert der Scan-Prozess die Bildrate [15].

Die zweite Möglichkeit besteht darin, im Objekt selbst zu unterbinden, dass zwei nicht aufgelöste Punktobjekte zeitgleich Licht aussenden und im Fernfeld übereinander abgebildet werden. Es ist daher zwingend notwendig, dass zuerst im Objekt ausgewählt wird, welche Objektpunkte Licht aussenden können, bevor dieses dann abgebildet werden. Die klassischen Prozesse Absorption, Streuung, Phase oder Polarisation lassen sich jedoch nur sehr schwer kontrollieren. Die Entdeckung und Entwicklung von Fluorophoren löst das Problem. (Photoschaltbare (*engl.: photoswitchable*)) Fluorophore können zuerst zufällig oder gezielt an- und abgeregt werden, bevor deren Emission abgebildet wird. Hierdurch ist es möglich die Emission von Licht zweier Fluorophore *zeitlich* oder *räumlich* zu trennen.

Deutlich Abstrakter ist die Betrachtung der Hochauflösung nicht im Orts- sondern im Frequenzraum. Hier wird ein jedes Objekt als Summe von Wellen dargestellt. Je höher die Frequenz einer Welle, desto kleiner die Struktur die es im Ortsraum erzeugt. Die Bedeutung der Zweipunktauflösung verliert in dieser Interpretation erheblich an

Bedeutung. Ziel einer guten Abbildung ist es vielmehr, möglichst viele dieser Wellen möglichst verlustfrei zu übertragen. Das Abbe-Limit steht hierbei für die maximal mögliche Frequenz einer übertragbaren Struktur. Hochauflösung ist möglich, indem die Frequenzen einer Welle *moduliert* - d.h. die Raumfrequenz reduziert - werden kann. Dann ist eine Übertragung möglich und Informationen über dem Abbe-Limit sind im Bild vorhanden - wenn auch vorerst bei anderen Frequenzen dargestellt.

1.2. Hochauflösungs-Mikroskopie

1.2.1. Zeitliche Trennung - PALM / STORM

Zeitliche Trennung heißt sicherzustellen, dass Fluorophore nacheinander Licht aussenden [16]. Experimentell kann dies mit photoschaltbaren Fluorophoren umgesetzt werden. Diese können stochastisch aktiviert werden und leuchten anschließend, bis sie wieder deaktiviert werden. Die PSF im Bild wird sich ein klein wenig bewegen¹, wenn ein Fluorophor ausgeht und ein Anderer zu Leuchten anfängt. Deshalb ist es vorteilhaft, nur einen Bruchteil der Fluorophore einer Punktwolke anzuregen, um diese einzeln abzubilden und dann mit hoher Genauigkeit Lokalisieren zu können. Die Aufnahme vieler solcher Bilder - mit stets anderen leuchtenden Fluorophoren - kann zu einem hochauflösten Bild zusammengesetzt werden. Eine Auflösung von 2 nm wurde nachgewiesen. Parallel entwickelt wurde dies von Betzig als Photoactivated Localization Microscopy (PALM) und von Rust als Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). Die zeitliche Auflösung liegt im Bereich von Minuten, da mindestens 10.000 Rohbilder notwendig sind [17, 18]. Genügt eine geringere Genauigkeit der Lokalisation, so kann die zeitliche Auflösung verbessert werden. Cox et al. zeigen beispielsweise eine Lokalisation mit einer Genauigkeit von 50nm, welche im Gegenzug eine zeitliche Auflösung von 4 Sekunden erreicht [19].

1.2.2. Räumliche Trennung - Konfokal und STED

Räumliche Trennung heißt, durch eine räumlich begrenzte, wohldefinierte und bekannte Anregung zu wissen, woher das Licht - und sei die abbildende PSF noch so groß - stammen muss. Durch das Einsetzen einer Lochblende in einer Zwischenbildebene (auf welche das emittierte Licht abgebildet wird) können unerwünschte und defokussierte Objekte außerhalb des Fokus unterdrückt werden [20]. Durch die Entwicklung des Konfokalmikroskops durch Minsky 1957, gelang es erstmals das Abbe-Limit zu überwinden. Das Objekt wird durch einen fokussierten Lichtstrahl beleuchtet und auf

¹Die Distanz entspricht dem durch das Mikroskop vergrößerte Abstand der beiden Punktobjekte.

eine Lochblende abgebildet. Objekte die sich außerhalb der Fokusebene des Objektivs befinden, werden nicht scharf auf die Lochblende abgebildet, wodurch sie an Helligkeit verlieren. Konfokale Mikroskope zeichnen sich daher durch eine hohe axiale Auflösung aus [21].

Je kleiner der Anregungsspot, desto präziser ist die Position des Emitters bekannt. Stimulated Emission Depletion (STED) verwendet zwei verschiedene Laserstrahlen um einen kleinstmöglichen Fokus zu generieren. Der erste Strahl formt einen klassischen Fokus in dessen Bereich die Fluorophore angeregt werden. Die Wellenlänge des zweiten Strahles ist so gewählt, dass er die angeregten Fluorophore durch stimulierte Emission auf das Grundniveau abregt. Der Fokus des zweiten Strahles hat jedoch einen Querschnitt eines Doughnuts mit keiner Intensität in seiner Mitte. Daher bleiben ausschließlich die Fluorophore in der Mitte angeregt, deren Fluoreszenz anschließend abgebildet wird [22]. Eine Zweipunktauflösung von 6 nm wurde experimentell in lebenden Zellen nachgewiesen [23]. STED benötigt Fluorophore mit langen Lebenszyklen, welche trotz des häufigen An- und Abschaltens nicht bleichen. Des Weiteren benötigt die stimulierte Emission hohe Intensitäten, welche nachweislich phototoxische Schäden in lebenden Zellen verursacht [24].

1.2.3. Modulation der Frequenzen - SIM

Um eine Modulation der Frequenzen zu ermöglichen, müssen die Fluorophore mit einer strukturierten Beleuchtung angeregt werden. Die beste Modulation entsteht aus einem Beleuchtungsmuster mit möglichst feinen und sinusartigen Streifen. Daher heißt diese Technik Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) und wurde von Heintzmann und Gustafsson parallel entwickelt [25, 26]. SIM hat eine laterale Auflösung von 100nm [27]. Durch das Anwenden nichtlinearer Effekte (NL-SIM) wurde eine laterale Auflösung von 50 nm experimentell nachgewiesen [28, 29].

Die in der Probe stattfindende Modulation der Frequenzen ist ähnlich in der Akustik und kann so leicht verstanden werden. Das menschliche Ohr nimmt eine Schallwelle nicht als Schwingung (mit unbekannter Frequenz), sondern nur als konstanten Ton wahr. Erklängen jedoch zwei ähnlich *hochfrequente* Töne zeitgleich, so ist eine *niederfrequente* Schwebung - eine Modulation der Lautstärke - zu vernehmen [30].

1.2.4. Vergleich der Methoden für lebende Zellen

Die Aufnahme der zeitlichen Entwicklung einer lebenden Zelle erfordert eine Vielzahl von Bildern. Daher ist die Zelle einer hohen Beleuchtungsdosis ausgesetzt, welche phototoxische Schäden hervorrufen kann. Beispielsweise wird die Wachstumsrate von Mi-

krotubuli unter Bestrahlung reduziert, weit unter der Dosis, welche die Zellteilung verhindert und die Zelle absterben lässt [31]. Daher ist es schwierig festzustellen, ob der zu untersuchende biologische Prozess in der Zelle unbeeinflusst abgebildet wurde. Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung arbeitet mit deutlich geringen Beleuchtungsintensitäten als STED, sodass die Zelle besser in ihrem natürlichen Verhalten untersucht werden kann. Darüber hinaus zeigen experimentelle Daten, dass (bei gleicher Anzahl detektierter Photonen) SIM bzw. NL-SIM eine höhere Auflösung als STED erzielt [32]. Auch ein Konfokalmikroskop kann die gleiche Auflösung wie SIM erzielen, wenn die Lochblende nahezu vollständig geschlossen wird [20]. Das Schließen der Lochblende geht aber ebenfalls mit einem hohen Verlust an Photon einher, sodass auch diese Methode mehr Photonen für die gleiche Auflösung benötigt. SIM nutzt daher das vorhandene *Photonenbudget* besser als die anderen Techniken. Die notwendige Bildverarbeitung in SIM ist jedoch aufwendig und kann zu Bildartefakten führen. Daher steht auch SIM in der Kritik, die Zelle nicht wahrheitsgemäß abzubilden [24].

1.3. Bildartefakte durch Bewegung

Nach der Auflösungssteigerung mit SIM in der Abbildung einer lebenden Zelle zu streben verliert jeglichen Sinn, wenn sich die Position der abzubildenden Fluorophore während der Aufnahmedauer aller Bilder mehr verändert, als die Halbwertsbreite der finalen SIM PSF (≈ 100 nm) breit ist [33]. Die Bewegung der Probe wird auf die Kamera übertragen, sodass selbst eine perfekte Abbildung zu einem unscharfen Bild führt, das nicht besser ist als die Abbildung mit einem klassischen Mikroskop. Zudem kreiert die SIM-Rekonstruktion - die auf der Annahme einer stationären Probe basiert - Artefakte.

1.3.1. Aufnahmegeschwindigkeit

Folglich ist es unabdingbar die notwendigen SIM Rohbilder so schnell wie möglich aufzunehmen, sodass selbst eine hohe Geschwindigkeit des Objektes nur zu wenig Bewegung in den Bildern führt [2].

Die ersten SIM-Mikroskope verwendeten ein mechanisch bewegliches Beugungsgitter um die Streifenbeleuchtung erzeugen und variieren zu können. Die mechanischen Komponenten, wie sie beispielsweise im Elyra S.1 (Zeiss, Jena) verwendet werden, sind jedoch langsam. Stattdessen werden heutzutage u.a. *Spatial Light Modulator* (SLM)

²Um die Fluorophore nicht unnötig zu bleichen, werden zwar alle Rohbilder für eine SIM Aufnahme so schnell wie möglich aufgenommen, für ein zweites SIM-Bild aber entsprechend gewartet, sodass der zu beobachtende biologische Prozess auch signifikant fortgeschritten ist. Andernfalls bleicht die Probe, bevor der Prozess abgeschlossen ist.

verwendet, um die Muster elektrooptisch - und damit wesentlich schneller - zu erzeugen [34, 35], [RF2] und [RF3].

Ist ausschließlich die axiale Auflösungssteigerung von Interesse, so ist es möglich die Probe mit allen notwendigen Beleuchtungsgittern gleichzeitig anzuregen, indem anstatt der Intensität die Richtung der linearen Polarisation des Anregungslasers moduliert ist. Analysatoren in der Detektion sind dann in der Lage diese Polarisationsmodulation in eine Intensitätsmodulation umzuwandeln (picoSIM) [36]. Der praktische Nutzen dieser Methode wurde jedoch noch nicht nachgewiesen.

Die kontinuierliche Verbesserung von Auslesezeit, Ausleserauschen, Quanteneffizienz und Kosten von Kameras reduziert die praktisch mögliche Aufnahmedauer zusätzlich. Zudem ist es möglich die Kamera auch teilweise während des Auslesens zu beleuchten, sodass dabei noch weniger Zeit verloren geht [RF4].

Die Intensität des Fluoreszenz-Signals wird durch die Entwicklung neuer Laser mit höheren Leistungen und Fluorophoren mit der notwendigen Photostabilität und Quanteneffizienz erhöht [RF5].

1.3.2. Abbildbare Prozesse mit SIM

Für die biologische Anwendung ist es daher zwingend erforderlich abzuschätzen, ob SIM die zu untersuchenden Probe tatsächlich hochaufgelöst abbilden kann. Tabelle 1 zeigt die Geschwindigkeiten v verschiedener Zellen und deren Komponenten. Zusätzlich ist die Zeit τ_{FWHM} angegeben, die das Objekt benötigt um die Halbwertsbreite der SIM PSF zu durchqueren. Für eine gerichtete Bewegung sind die Geschwindigkeiten aus der Literatur bekannt [37], während ein vergleichbarer Wert v_{eff} für eine Diffusion, unter Zuhilfenahme des Fickschen Gesetzes und der Belichtungszeit abgeschätzt werden müssen (siehe A.1).

Tabelle 1 zeigt, dass die Geschwindigkeit nicht mit der Größe einer Komponente zusammenhängt. E.coli bewegt sich beispielsweise 10-mal schneller als ein großes Protein durch eine Zellwand diffundiert [37]. Doch selbst der schnellste Aufnahmemodus von SIM (2-Strahl ohne z-scan) ist deutlich zu langsam um eben jene Diffusion aufzuzeichnen. Nicht jeder Prozess kann durch SIM abgebildet werden [27]. Jedoch kann beispielsweise die (De-)Polymerisation von Mikrotubuli während der Zellteilung aufgenommen werden [35]. Liegt ein wichtiger Teil der biologischen Information jedoch 3-Dimensional vor, so muss auch ein z-scan erfolgen. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist entsprechend langsamer, sodass beispielsweise das Wachstum von Aktin-Filamenten nicht in 3D aufgenommen werden kann. Sehr langsame Vorgänge - wie zum Beispiel die Bewegung von Mitochondrien und Vesikeln oder auch das Cytoskelett - kann in

Zelle / -komponente	$D[\frac{\mu m^2}{s}]$	$v_{(eff)}[nm/s]$	$\tau_{FWHM}[s]$
Diffusion kleiner Proteine im eukaryotischen Zytoplasma	30 \rightarrow	1,800,000	0.000 056
Gerichtete Bewegung von E. coli		22,000	0.004 5
Diffusion großer Proteine in der Zellmembran	0.03 \rightarrow	1,800	0.056
2D - Aufnahmedauer 2-Strahl-SIM [RF3]			0.12
2D - Aufnahmedauer Blaze-SIM (OMX, Vereinigtes Königreich) [38]			0.15
Mikrotubulus Depolymerisation während der Zellteilung		500	0.20
Wachstum von Aktin-Filamenten		320	0.31
Translation des Motorproteins Myosin II		200	0.50
3D - Aufnahmedauer Blaze-SIM (OMX, Vereinigtes Königreich) [38]			1.6
3D - Aufnahmedauer 3-Strahl-SIM [RF3]			2.2
Mikrotubulus Polymerisation während der Zellteilung		30	3.3
3D - Aufnahmedauer Elyra S. 1 (Zeiss, Deutschland) [39]			13
Gerichtete Bewegung einer kleinen menschlichen H69 Zelle (Lungenkrebs)		4.4	23

Tabelle 1: Diffusionskoeffizient D und Geschwindigkeit v verschiedener Zellen und deren Komponenten [37]. Die Zeit die Halbwertsbreite der PSF zu durchqueren ist τ_{FWHM} . SIM-Parameter: Belichtungszeit je Rohbild: 10 ms; ROI = $(33 \times 33)\mu m^2$; 16 z-Schichten. Viele biologische Prozesse sind zu schnell für SIM.

lebenden, fixierten oder sich nur langsam bewegenden Zellen in 3D und als Zeitserie aufgenommen werden [40]. Das kommerzielle Gerät Elyra S. 1 ist nur für die hochaufgelöste Aufnahme von fixierten Proben oder sehr langsamen biologischen Prozessen geeignet.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Die Aufnahme von lebenden biologischen Zellen durch Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung leidet an Bewegungsartefakten. Diese nehmen mit steigender Geschwindigkeit der abgebildeten Struktur zu und sind nur im Extremfall als Artefakte zu identifizieren.

Um das Auftreten von Bewegungsartefakten im Vorfeld zu unterbinden, lohnt sich eine Abschätzung der Geschwindigkeit der zu beobachtenden Struktur und ein Vergleich mit der Aufnahmegeschwindigkeit des verwendeten Mikroskops [41]. Zellkomponenten können jedoch auch ruckartige Bewegung vollführen, sodass diese Abschätzung nicht ausreicht, um Bewegungsartefakte sicher auszuschließen [42]. Kner et al. sehen beispielsweise deutliche Bewegungsartefakte in ihren SIM-Daten beim Aufbrechen von Mikrotubuli [35].

Die Regeln *guter wissenschaftlicher Praxis* fordern „alle Ergebnisse konsequent selbst anzuzweifeln“ [43]. Zweifel, an der Richtigkeit der Abbildung und den daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen, können bisher nicht widerlegt werden, da es kein Verfahren gibt, welche Bewegungsartefakte in SIM-Bilder sicher identifiziert. Dies führt zu Kritik an Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung [24, 32, 44].

Ziel dieser Arbeit ist die vollautomatische Detektion und Lokalisation von Bewegungsartefakten. Dies ist ein elementarer Schritt um die Glaubwürdigkeit einer SIM-Aufnahme zu verifizieren, sodass die eigentliche Aufgabe - die Erforschung der Zelle - im *Fokus* stehen kann.

2. Konzepte der Mikroskopie und Bildverarbeitung

2.1. Fluoreszenz

2.1.1. Jablonski-Diagramm

Atome und Moleküle können Photonen absorbieren, wodurch die Energie des Photons vollständig in das Elektronensystem des Atoms oder Moleküls übergeht. Dadurch können Elektronen in energetisch höhere Molekülorbitale übergehen und Bindungen in Form von Vibration oder Rotation angeregt werden. Umgekehrt, kann überschüssige Energie in Photonen, aber auch Wärme umgewandelt werden. Das Jablonski-Diagramm veranschaulicht die verschiedenen Energieniveaus sowie deren Übergänge und soll hier am Beispiel der Fluoreszenz erläutert werden (s. Abbildung 2.1).

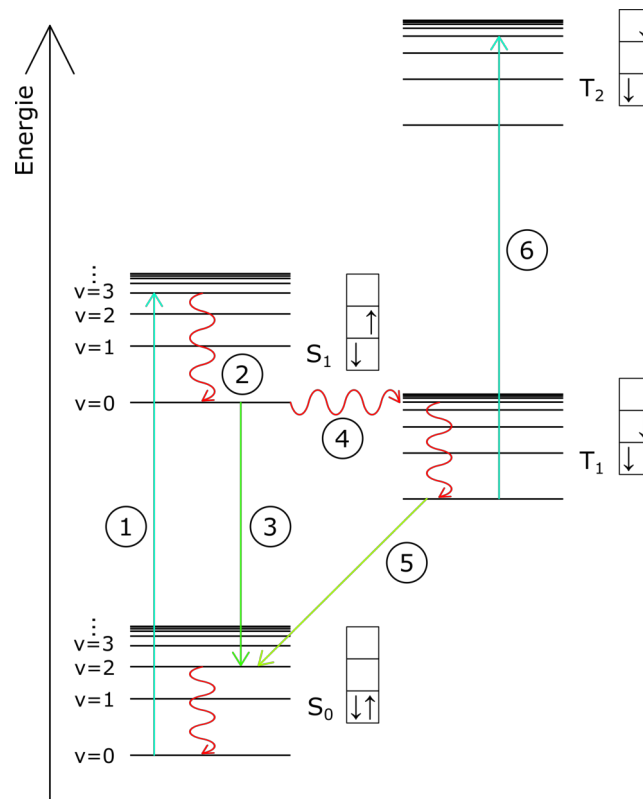


Abbildung 2.1: Jablonski-Diagramm: 1 - Anregung, 2 - Schwingungsrelaxation, 3 - Fluoreszenz, 4 - Interkombination, 5 - Phosphoreszenz, 6 - Triplett-Leiter; Jeder Energiezustand hat mehrere Vibrationszustände v . Der Spin der Elektronen ist rechts der Energieniveaus dargestellt. (Inspiziert aus [45])

Das System befindet sich anfangs im Grundzustand. Alle Molekülorbitale sind, beginnend mit dem energetisch niedrigsten, von unten nach oben mit Elektronen besetzt. Der in Abbildung 2.1 dargestellte Grundzustand ($S_0, v=0$) ist das höchste besetzten

Molekülorbital (Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO)). Alle darunterliegenden Zustände sind nicht gezeigt. Im HOMO befinden sich zwei antiparallele Elektronen, sodass der Gesamtspin 0 ist. Hieraus ergibt sich die Multiplizität oder Entartung^[3] zu 1. Daher handelt es sich um den Singulett Grundzustand S_0 .

1. Ein Photon mit geeigneter Wellenlänge und damit Energie kann eines der beiden Elektronen aus S_0 in das nächst höhere Orbital S_1 heben. Der Übergang zwischen beiden Zuständen erfolgt innerhalb einer Femtosekunden und ist damit wesentlich schneller als eine Kernschwingungsperiode (≈ 100 fs), welche demnach hier vernachlässigt werden kann [45]. Demnach ändern sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Niveaus während des Überganges nicht. Ein Elektron kann umso besser zwischen zwei Niveaus wechseln, je mehr die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten beider Niveaus übereinstimmen. Nur dadurch kann es vom Ausgangs- in den Endzustand gelangen (Franck-Condon Faktor).

Da Elektronen höherenergetischer Zustände im Schnitt weiter vom Atomkern entfernt sind, gelingt eine Anregung deutlich besser in deren höhere Vibrationszustände, da diese eine höherer Aufenthaltswahrscheinlichkeit in Kernnähe haben als die Vibrationsgrundmode [45].

2. Die Lebensdauer von Vibrationszuständen ist in der Größenordnung von 1 ps in Lösung, da die Vibration durch Stöße mit umliegenden Molekülen in Wärme umgewandelt wird, sodass keine Strahlung entsteht. Ausgehend vom angeregten Zustand S_1 gibt es zwei dominierende Möglichkeiten wie das System zum Grundzustand zurückkehren kann (3 und 4) [45].
3. Die typische Lebensdauer von S_1 beträgt bei guten Fluorophoren 1 ns für die spontane Emission eines Photons (Fluoreszenz). Analog zur Anregung, erfolgt der Übergang meist in angeregte Vibrationszustände. Durch die Vielzahl von möglichen Übergängen ist die spektrale Bandbreite von Fluoreszenz relativ breit ($\approx 20 - 50$ nm). Da Energie durch die Vibrationsrelaxation verloren geht, ist die Fluoreszenz stets rotverschoben (Stokes-Verschiebung). Spontan emittiertes Licht ist inkohärent, da der für Kohärenz notwendige Phasenbezug bei den obigen Relaxationsprozessen verloren geht.
4. Alternativ zur spontanen Emission von Licht kann es auch zur Interkombination (engl.: Intersystem crossing) kommen. Dabei klappt der Spin eines Elektrons um, sodass sich der Triplett-Zustand T_1 bildet (Entartung ist 3). Dieser Effekt

³Die Entartung eines Systems ist definiert durch seinen Gesamtspin S als $2S + 1$

hat normalerweise eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit als eine fluoreszente Emission.

5. Der Triplett Zustand ist ein langlebiger Zustand, da für einen Übergang in den Grundzustand (die Phosphoreszenz) der Spin erneut umklappen muss. Die Lebenszeit variiert sehr stark zwischen verschiedenen Atomen und Molekülen, sowie den Aggregatzuständen. In den meisten Atom- und Molekülsystemen ist die Lebenszeit im Bereich von Mikrosekunden bis Minuten [45, 46]. Ein Übergang zurück in den S_1 Zustand ist nicht möglich, sodass ein fluoreszentes Molekül in einem Triplett-Zustand unnütz ist, bis es selbständig auf das Grundniveau herabfällt. Man spricht hier von Phosphoreszenz.
6. Durch eine erneute Anregung mit dem Beleuchtungslicht kann sogar eine Anregung in höhere Triplett-Zustände $T_{2,3,\dots}$ erfolgen. Was eine Rückkehr in den gewünschten fluoreszenten Kreislauf zwischen Singulett Zuständen verhindert [2, 45].

Die Ansprüche an Fluorophore sind hoch. Die Absorptionsrate muss möglichst hoch sein, um die Probe möglichst wenig (schädlichem) Licht aussetzen zu müssen. Zudem muss die fluoreszente Emission mit hoher Wahrscheinlichkeit erfolgen, sodass Bleichen verhindert wird. Zudem dürfen die Fluorophore durch ihre chemische Struktur die Zelle nicht beeinflussen.

2.2. Die optische Abbildung

Die folgende Einführung in die Grundlagen der optischen Abbildung in der Fluoreszenzmikroskopie setzt voraus dass:

- a) o.B.d.A. die Vergrößerung M des Systems 1 ist.
- b) das System ist frei von Aberrationen.
- c) die Fluorophore nicht bleichen und sich linear verhalten, d.h. die Intensität der fluoreszenten Emission des Objektes $S(\vec{r})$ (engl.: specimen) ist proportional zur Anregungsintensität $I(\vec{r})$ und der Fluorophordichte im Objekt $\varrho(\vec{r})$ ^[4]:

$$S(\vec{r}) = I(\vec{r}) \cdot \varrho(\vec{r}) \quad (2.1)$$

⁴Der Proportionalitätsfaktor wird der Anschaulichkeit halber auf 1 gesetzt [47].

Für das emittierte E-Feld der Fluorophore E_S gilt demnach:

$$|E_S(\vec{r})| \sim \sqrt{S(\vec{r})} \sim \sqrt{\varrho(\vec{r})} \quad (2.2)$$

Darüber hinaus wird der elektromagnetische sowie der quantenmechanische Charakter des Lichtes vernachlässigt und sich lediglich auf den skalaren Teil der Wellenfunktion beschränkt (Wellenoptik). Dies genügt für die Beschreibung der optischen Abbildung [48].

2.2.1. ATF - Amplituden Transferfunktion

Die Abbildung der, durch die Fluoreszenzverteilung $\varrho(\vec{r})$, im Objekt erzeugten Intensitätsverteilung durch das optische System kann sowohl im Orts- als auch im Frequenzraum, welche durch die Fouriertransformation verknüpft sind, beschrieben werden^[5]. Durch die Fourier-Analyse kann eine jede Objektstruktur als Summe ebener Wellen dargestellt werden [36, 49]. Insbesondere kann das emittierte E-Feld eines einzelnen Fluorophores $E_S^{(punkt)}$ an der Stelle \vec{r}_0 im Fourierraum geschrieben werden zu ^[6]:

$$E_S^{(punkt)}(\vec{r}, \vec{r}_0) = \sqrt{S(\vec{r}_0)} \cdot \delta(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (2.3)$$

$$\tilde{E}_S^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0) = \sqrt{S(\vec{r}_0)} \cdot e^{-i\vec{k}\vec{r}_0} \quad (2.4)$$

Das E-Feld des einzelnen Emitters ist demnach eine Superposition aus allen physikalisch möglichen Wellen. Zudem tragen alle Wellen zum gleichen Teil bei, wobei die Position der Punktquelle in der individuelle Phase einer jeden Welle ($e^{-i\vec{k}\vec{r}_0}$) kodiert ist. (Abb. 2.2 a)) [50].:

Die wohldefinierte Emissionswellenlänge der Fluoreszenz erlaubt jedoch nur den Wellenvektor $k_{em} = \frac{2\pi}{\lambda_{em}}$. Dies reduziert die real existierenden ebenen Wellen auf die s.g. Ewaldkugel ^[7] (dargestellt in Abb. 2.2 a) als blauer Kreis) [51].

Die in alle Raumrichtungen laufenden Wellen werden nur dann von der Linse abgebildet, wenn sie durch deren Apertur \tilde{p} der Linse treffen (grüne Linie). Dies geschieht wenn der Winkel β zwischen der Welle und der optischen Achse (hier die z-Achse) klei-

⁵Eigenschaften der Fouriertransformation sind im Anhang A.2 dargestellt.

⁶Der Proportionalitätsfaktor wird der Anschaulichkeit halber auf 1 gesetzt

⁷Die Emissionswellenlänge wird als scharf angenommen.

ner ist, als der halbe Öffnungswinkel α der Linse. Ob eine Welle die Linse trifft hängt somit ausschließlich von der lateralen Frequenz ab (s. Anhang A.3).

$$\tan \beta = \frac{k_{lat}}{k_z} \quad \text{mit: } k_{lat} = \sqrt{k_x^2 + k_y^2} \quad (2.5)$$

$$\tilde{p}(k_{lat}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn: } \beta \leq \alpha \text{ bzw. } k_{lat} \leq \frac{2\pi \cdot \text{NA}}{\lambda} \\ 0, & \text{sonst} \end{cases} \quad (2.6)$$

Nur Wellen welche die Apertur des Objektivs passieren tragen zur Abbildung des Objektes bei. Die zur Feldverteilung im detektierten Bild $E_D^{(punkt)}$ beitragenden Wellen werden durch die Amplituden Transferfunktion (ATF) $\tilde{a}(\vec{k})$ (s. gelber Kreisbogen in Abb. 2.2 a)) beschrieben:

$$\xrightarrow{Gl. 2.4} \tilde{E}_D^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0) = \underbrace{\sqrt{S(\vec{r}_0)} \cdot e^{-i\vec{k}\vec{r}_0}}_{\tilde{E}_S^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0)} \cdot \underbrace{\delta(|\vec{k}| - |\vec{k}_{em}|)}_{\tilde{a}(\vec{k})} \cdot \tilde{p}(k_{lat}) \quad (2.7)$$

$$\tilde{E}_D^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0) = \tilde{E}_S^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0) \cdot \tilde{a}(\vec{k}) \quad (2.8)$$

Im Falle einer kohärenten Bildgebung - bei der alle elektrischen Felder miteinander wechselwirken (interferieren) - summieren sich die einzelnen abgebildeten E-Felder $\tilde{E}_D^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0)$ im Frequenzraum zum Gesamtfeld $\tilde{E}_I(\vec{k})$:

$$\tilde{E}_D(\vec{k}) = \int_{\infty} \tilde{E}_D^{(punkt)}(\vec{k}, \vec{r}_0) d\vec{r}_0 = \tilde{a}(\vec{k}) \int_{\infty} \sqrt{S(\vec{r}_0)} \cdot e^{-i\vec{k}\vec{r}_0} d\vec{r}_0 = \tilde{a}(\vec{k}) \cdot \tilde{E}_S(\vec{k}) \quad (2.9)$$

2.2.2. APSF - Amplituden Punktspreizfunktion

Die Fouriertransformation (gekennzeichnet durch den Operator \mathcal{F}) der ATF zeigt die Amplitudenverteilung der Abbildung eines Punktoobjektes im Ortsraum. Die Amplituden Punktspreizfunktion (APSF) $a(\vec{r})$ (s. Abb. 2.2 b)) ist demnach:

$$a(\vec{r}) = \mathcal{F} \{ \tilde{a}(\vec{k}) \} \quad (2.10)$$

Durch die APSF kann die Abbildung des elektrischen Feldes im Objekt wie folgt bestimmt werden:

$$\xrightarrow{Gl. 2.9} E_D(\vec{r}) = (E_S \otimes a)(\vec{r}) \quad (2.11)$$

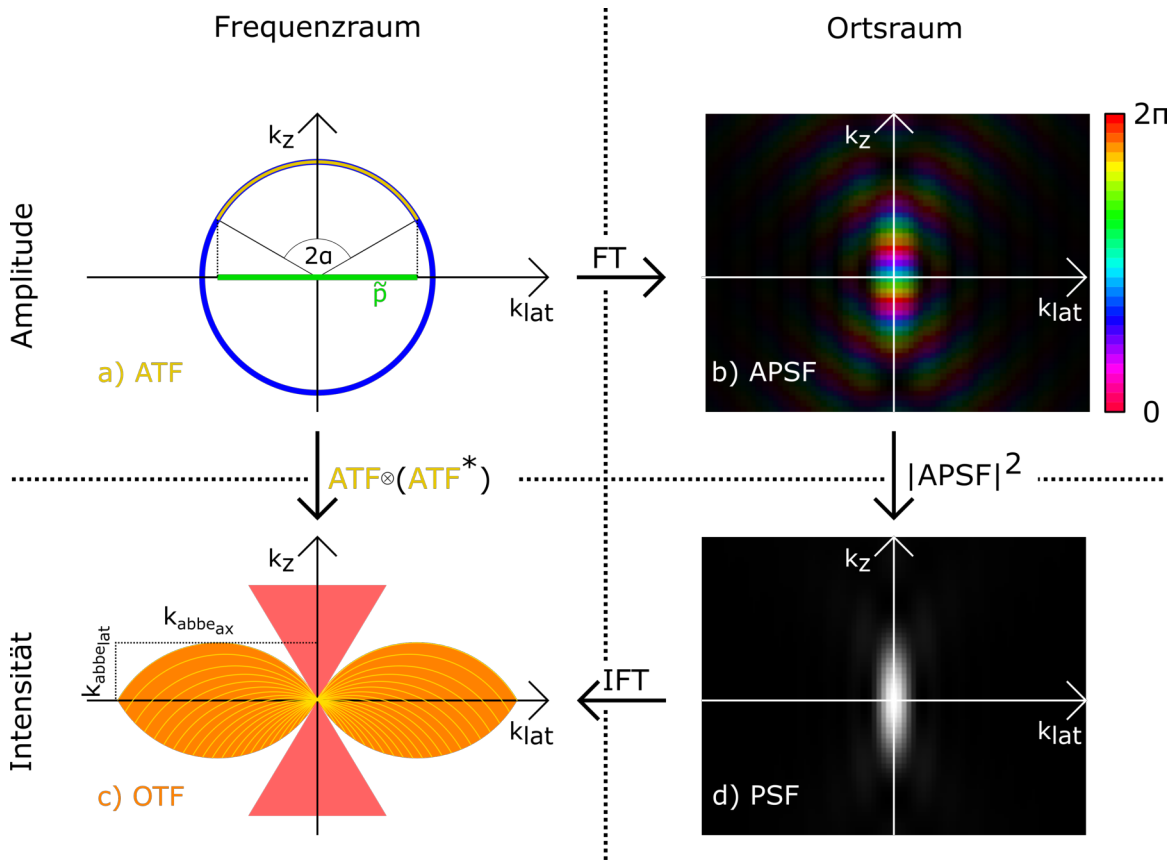


Abbildung 2.2: a) Ewald Kugel (blau), Öffnungswinkel α , Amplituden Transfer Funktion (gelb); b) Amplituden Punktspreizfunktion: Helligkeit und Farbe zeigen hierbei Amplitude bzw. die Phase des Feldes; c) (Inkohärente) Optische Transferfunktion mit mising cone (rot); d) Punktspreizfunktion (Inspiriert durch [47, 52])

2.2.3. PSF - Punktspreizfunktion

Fluoreszentes Licht hingegen ist inkohärent, sodass die elektrischen Felder verschiedener Objektpunkte nicht interferieren können. Daher genügt es die Intensitäten zu betrachten. Die Intensität des Bildes eines Punktojektes - die Punktspreizfunktion (PSF) $h(\vec{r})$ (Abb. 2.2 d)) - ergibt sich als Betragsquadrat seines E-Feldes ^[8]:

$$h(\vec{r}) = |a(\vec{r})|^2 = a(\vec{r}) \cdot a^*(\vec{r}) \quad (2.12)$$

⁸“ a^* “ kennzeichnet hierbei die komplex konjugierte von a .

Das detektierte Bild $D^{(punkt)}(\vec{r})$ eines einzelnen Fluorophors an der Stelle \vec{r}_0 ist demnach:

$$D^{(punkt)}(\vec{r}, \vec{r}_0) = |E_D^{(punkt)}(\vec{r}, \vec{r}_0)|^2 = |(E_S^{(punkt)}(\vec{r}_0) \otimes a)(\vec{r})|^2 \quad (2.13)$$

$$= |\sqrt{S(\vec{r}_0)} \cdot a(\vec{r} - \vec{r}_0)|^2 = S(\vec{r}_0) \cdot h(\vec{r} - \vec{r}_0) \quad (2.14)$$

Das Gesamtbild D ist die Summe aller Einzelbilder $D^{(punkt)}$ eines jeden Fluorophors:

$$D(\vec{r}) = \int_{-\infty}^{\infty} D^{(punkt)}(\vec{r}, \vec{r}_0) d\vec{r}_0 = \int_{-\infty}^{\infty} S(\vec{r}_0) \cdot h(\vec{r} - \vec{r}_0) d\vec{r}_0 \quad (2.15)$$

$$= [S \otimes h](\vec{r}) = [(I(\vec{r}') \cdot \varrho(\vec{r}')) \otimes h](\vec{r}) \quad (2.16)$$

Die Abbildung der fluoreszenten Emission S im Objekt wird durch die PSF und einer Faltung beschrieben. Die homogene Beleuchtung im Weitfeld ($I(\vec{r}') = I_0$) ist lediglich ein Skalierungsfaktor der die Helligkeit des Bildes bestimmt.

$$D(\vec{r}) = I_0 \cdot [\varrho \otimes h](\vec{r}) \quad (2.17)$$

Um das Objekt perfekt abbilden zu können, müsste die PSF $\delta(0)$ entsprechen. Durch den Wellencharakter des Lichtes ist dies aber unmöglich.

2.2.4. OTF - Optische Transferfunktion

Die inverse Fouriertransformation der PSF erzeugt die Optische Transferfunktion (OTF) $\tilde{h}(\vec{k})$. Die OTF ist hierbei die Autokorrelation der ATF und kann entsprechend konstruiert werden (Dies ist durch wiederholtes Abtragen der (gelben) ATF in der orangen OTF in Abb. 2.2 c) angedeutet.):

$$\tilde{h}(\vec{k}) = \mathcal{F}^{-1} \{h(\vec{r})\} = \mathcal{F}^{-1} \{a(\vec{r}) \cdot a^*(\vec{r})\} = \tilde{a}(\vec{k}) \otimes \tilde{a}^*(-\vec{k}) = [\tilde{a} \star \tilde{a}](\vec{k}) \quad (2.18)$$

Analog zur ATF, beschreibt die OTF welche Frequenzen der Intensitätsverteilung des Objektes in die des Bildes übertragen werden:

$$\xrightarrow{2.16} \tilde{D}(\vec{k}) = [\tilde{I} \otimes \tilde{\varrho}](\vec{k}) \cdot \tilde{h}(\vec{k}) = \tilde{S}(\vec{k}) \cdot \tilde{h}(\vec{k}) \quad (2.19)$$

Die OTF ist ein Tiefpass, sodass nur Frequenzen unterhalb des s.g. Abbe-Limits übertragen werden können (s. Anhang A.3). Daher kann lateral keine Gitterstruktur, die kleiner als d_{Abbe} ist, abgebildet werden:

$$k_{Abbe_{lat}}(\lambda, NA) = 2\pi \cdot \frac{2NA}{\lambda} \quad (2.20)$$

$$d_{Abbe_{lat}}(\lambda, NA) = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.21)$$

Axial gilt:

$$k_{ax_{max}}(\lambda, NA) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(n - \sqrt{n^2 - NA^2} \right) \quad (2.22)$$

$$d_{Abbe_{ax}}(\lambda, NA) = \frac{\lambda}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2} \right)} \quad (2.23)$$

Für ein modernes Weitfeld Fluoreszenzmikroskop ist daher eine laterale bzw. axiale Auflösung von 180 nm bzw. 470 nm möglich ^[9].

Eine zweite Eigenschaft der OTF ist, dass sie zwar lateral und axial ausgedehnt ist, aber entlang der k_z -Achse über keinerlei Transfer verfügt. Der, in Abb. 2.2 c) rot gekennzeichnete Bereich ohne Transfer, wird als „*missing cone*“ bezeichnet und ist für das fehlende *sectioning*, d.h. das Unterdrücken von Licht aus anderen Fokusschichten verantwortlich. Die Abbildung nur einer einzelnen Schicht ist mit einer Weitfeld Abbildung nicht möglich. Es wird stets das ganze Objekt abgebildet - Strukturen außerhalb des Fokus sind lediglich unscharf und Überlagern die scharfen Details im Fokus [47].

Der Transfer von Frequenzen von der Objekt- in die Bildebene erfolgt jedoch nicht ideal. Im Gegensatz zur idealen ATF (vgl. Gl. 2.6), werden in der OTF nicht alle übertragenen Frequenzen perfekt - d.h. mit Kontrast 1 - übertragen. Dies zeigt der Betrag von ATF bzw. OTF in Abb. 2.3. Es ist ersichtlich, dass der Kontrastübertrag einer inkohärenten Abbildung mit steigender Frequenz immer schlechter wird und am Abbe-Limit verschwindet [47, 53, 54]

2.2.5. Rekonstruktion 3-Dimensionaler Daten

Die Aufnahme des Bildes eines 3-Dimensional Objektes erfolgt lediglich durch einen 2-Dimensionalen Sensor. Um die dritte (axiale) Dimension wiederzugewinnen, muss das Objekt in mehreren Fokusschichten aufgenommen werden.

⁹ $\lambda = 520$ nm, $NA = 1.46$, $n = 1.518$

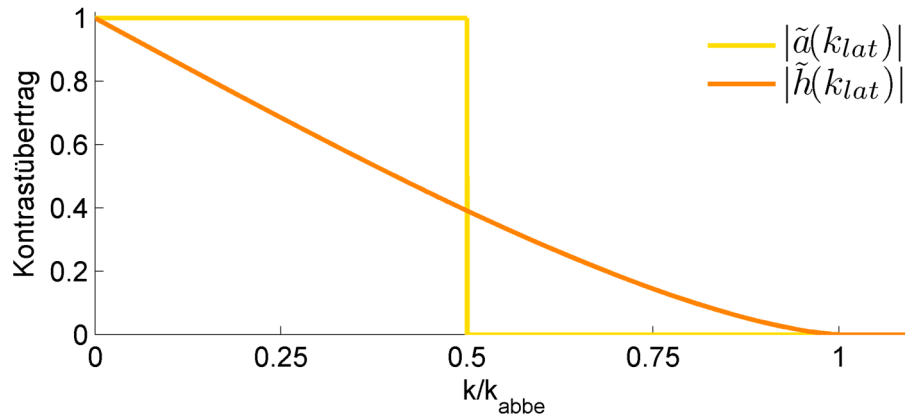


Abbildung 2.3: Kontrastübertrag von ATF (E-Feld; gelb) und OTF (Intensität; orange). Die ATF überträgt alle Frequenzen unterhalb der halben Abbe-Frequenz optimal mit Kontrast 1. Eine kohärente Bildgebung erlaubt eine Auflösungssteigerung durch schräge Beleuchtung. Das kohärente Abbe-Limit setzt sich daher aus der numerischen Apertur von Beleuchtung und Detektion zusammen: $d_{Abbe_{lat}} = \frac{\lambda}{NA_{bel} + NA_{det}}$. Die inkohärente OTF überträgt Frequenzen bis zum Abbe-Limit, jedoch werden diese mit steigender Frequenz gedämpft übertragen.

2.3. Wiener Entfaltung

Ist die OTF bekannt, zum Beispiel durch Aufnahme der PSF, so kann die Dämpfung von Frequenzen nachträglich numerisch invertiert werden, indem diese wieder entsprechend verstärkt werden. Frequenzen über dem Abbe-Limit können - ohne Annahmen über das Objekt zu machen - nicht wiedergewonnen werden. Diese s.g. Wieder Entfaltung ist limitiert durch das Rauschen n und kann aus Gl. 2.19 abgeleitet werden.

$$(Gl. 2.19) \quad \tilde{I}(\vec{k}) = \tilde{S}(\vec{k}) \cdot \tilde{h}(\vec{k}) + \tilde{n}(\vec{k}) \quad (2.24)$$

Im Idealfall ohne Rauschen ($\tilde{n}(\vec{k}) = 0$) wird der Einfluss der OTF schlicht invertiert. Dies ist jedoch nur für Frequenzen unterhalb des Abbe-Limits möglich, da der Nenner (die OTF) sonst auf 0 sinkt:

$$\tilde{I}_{wien}(\vec{k}) = \frac{1}{\tilde{h}(\vec{k})} \cdot \tilde{I}(\vec{k}) \quad \text{für: } k < k_{abbe} \quad (2.25)$$

Beinhaltet ein Bild jedoch Rauschen, so ist es nicht sinnvoll durch die OTF allein zu teilen, da andernfalls die Verstärkung von Frequenzen nahe des Abbe-Limits - die wenig Signal aber das gleiche Rauschen wie alle Frequenzen tragen - fast ausschließlich Rauschen verstärkt und das Qualität des Bildes sinkt. Daher muss das Rauschen durch

den Wiener Parameter ε abgeschätzt werden, der verhindert mehr Rauschen als Signal verstärkt wird [47, 55]:

$$\tilde{I}_{wien}(\vec{k}) = \frac{1}{\tilde{h}(\vec{k})} \cdot \frac{|\tilde{h}(\vec{k})|^2}{|\tilde{h}(\vec{k})|^2 + \underbrace{\frac{|\tilde{n}(\vec{k})|^2}{|\tilde{S}(\vec{k})|^2}}_{\varepsilon(\vec{k}) \approx \varepsilon}} \cdot \tilde{I}(\vec{k}) \quad (2.26)$$

$$= \frac{\tilde{h}^*(\vec{k})}{|\tilde{h}(\vec{k})|^2 + \varepsilon} \cdot \tilde{I}(\vec{k}) \quad (2.27)$$

2.4. Abtastung

Die Aufnahme der optischen Abbildung erfolgt digital durch eine Kamera. Dadurch werden die reellwertigen Größen Ort und Intensität diskretisiert. Eine verlust- und fehlerfreie Diskretisierung ist möglich, da das Bild keine höheren Frequenzen als die Abbefrequenz (f_{abbe}) beinhaltet. Dies ist durch zwei Lehrsätze begründet:

1. Das Nyquist-Theorem besagt, dass ein Sinus korrekt abgetastet wird, wenn mindestens zweimal pro Wellenlänge/Schwingungsdauer gemessen wird. Experimentell muss das Abbild der kleinstmöglichen Gitterperiode auf der Kamera - gegeben durch das Abbe-Limit (Gl. 2.21) und der Vergrößerung des Mikroskops - sich mindestens über 2 Pixel erstrecken.
2. Das Shannon Theorem beweist, dass die diskrete und äquidistante Messung eines bandlimitierten Signals unter Einhaltung des Nyquist-Limits es ermöglicht, das Signal an jeden Punkt zwischen den Stützstellen exakt zu rekonstruieren [56]. Die optische Abbildung ist durch das Abbe-Limit bandlimitiert ($\tilde{h}(k) = 0$ für $k < k_{abbe}$). Das äquidistante Sampling ist experimentell durch die präzise Fertigung des Kamerachips gegeben.

Das Nyquist-Limit und der Pixelabstand der Kamera bestimmt die minimal notwendige Vergrößerung des Mikroskops. Wird das Objekt zu wenig vergrößert, so werden zu hohe Frequenzen fälschlicherweise als kleinere Frequenzen aufgenommen (Aliasing). Wird es zu viel vergrößert gewinnt das Bild an sehr wenig Information^[10], während der abbildbare Bereich von Interesse (engl.: Region of Interest) (ROI) im Objekt unnötig verkleinert wird, während das Ausleserauschen vergrößert wird.

¹⁰Die OTF wird, durch die Integration der Intensität in einem jeden Pixel, bei höheren Frequenzen gedämpft. Ein feineres Abtasten reduziert diesen Prozess.

2.5. Rauschprozesse

Rauschen ist ein grundlegender physikalischer Prozess, welcher die Genauigkeit einer jeden Messung limitiert. Eine genaue Analyse des Rauschens ist notwendig um abzuschätzen, ob ein Experiment die notwendige Genauigkeit besitzt um eine physikalische Fragestellung mit hoher Sicherheit zu beantworten. Das Rauschen folgt stets einer diskreten oder kontinuierlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung, sodass jeder Wert x mit der Wahrscheinlichkeit $p(x)$ auftritt. Der Erwartungswert μ und die Varianz σ (ein Maß für die Breite der Verteilung) einer solchen Verteilung sind definiert durch:

$$\mu = \underbrace{\sum_{\forall x} x \cdot p(x)}_{\text{diskret}} = \underbrace{\int_{-\infty}^{\infty} x \cdot p(x)}_{\text{kontinuierlich}} \quad (2.28)$$

$$\sigma^2 = \underbrace{\sum_{\forall x} (x - \mu)^2 \cdot p(x)}_{\text{diskret}} = \underbrace{\int_{-\infty}^{\infty} (x - \mu)^2 \cdot p(x)}_{\text{kontinuierlich}} \quad (2.29)$$

Die Gesamtwahrscheinlichkeit ist auf 1 normiert:

$$\sum_{\forall x} p(x) = 1 \quad \int_{-\infty}^{\infty} p(x) dx = 1 \quad (2.30)$$

Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ist (abzüglich des Hintergrund c) definiert als:

$$\text{SNR} = \frac{\mu - c}{\sigma} \quad (2.31)$$

2.5.1. Poisson-Verteilung

Die Emission von Photonen ist ein diskreter Zufallsprozess. D.h. dass aus einer konstanten Intensität über einen großen Zeitraum nicht automatisch folgt, dass pro Zeiteinheit gleich viele Photonen abgestrahlt werden. Da die Zeiteinheit so klein gewählt werden kann, dass entweder keines oder genau ein Photon emittiert wird, liegt ein Poisson-Prozess vor [48, 57]. Die Wahrscheinlichkeit p genau x Photonen in einen Zeitraum zu messen ist gegeben durch die Poissonverteilung $\mathcal{P}\{\mu\}$:

$$x \sim \mathcal{P}\{\mu\} = \frac{\mu^x}{x!} \cdot e^{-\mu} \quad (2.32)$$

Der Erwartungswert μ entspricht hierbei der durchschnittlichen Anzahl eintreffender Photonen. Wird genau eine Messung durchgeführt, deren Resultat N_{mess} Photonen ist, so kann der Erwartungswert der zugrunde liegenden Poisson-Verteilung bestmöglich mit N selbst geschätzt werden [58]. Experimentell muss jedoch sichergestellt werden,

dass selbst wenn kein Photon gemessen wird ($N_{mess} = 0$), ein solches Ereignis als möglich erachtet wird ($\mu > 0$). Daher muss ein unbekannter Erwartungswert μ_{exp} ausgehend von einem einzelnen Messwert N_{mess} geschätzt werden zu:

$$\mu_{exp} \approx N_{mess} + 1 \quad (2.33)$$

In der Poisson-Verteilung entspricht der Erwartungswert der Varianz ($\mu = \sigma^2$). Das SNR einer Messung kann stets verbessert werden, indem mehr Photonen gemessen werden [48, 50]:

$$\text{SNR} = \frac{\mu}{\sigma} = \frac{N}{\sqrt{N}} = \sqrt{N} \quad (2.34)$$

Die Differenz z zweier Poisson-verteilter Zufallsvariablen $x_{1,2}$ mit individueller Verteilungsfunktion $\mathcal{P}\{\mu_{1/2}\}$ folgt der Skellam-Verteilung $\mathcal{S}\{\mu_1, \mu_2\}$. I_z ist hierbei die modifizierte Besselfunktion erster Ordnung [59]:

$$z = x_1 - x_2 \sim \mathcal{S}\{\mu_1, \mu_2\} = e^{-(\mu_1 + \mu_2)} \left(\frac{\mu_1}{\mu_2}\right)^{\left(\frac{z}{2}\right)} I_z(2\sqrt{\mu_1 \mu_2}) \quad (2.35)$$

2.5.2. Gauß-Verteilung

Die Normal- oder Gaußverteilung ist definiert durch die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $\mathcal{N}\{\mu, \sigma^2\}$:

$$x \sim \mathcal{N}\{\mu, \sigma^2\} = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.36)$$

Erwartungswert μ und Varianz σ^2 können verschiedene Werte einnehmen. Die Summe/Differenz z mehrerer Zufallsvariable x_i mit individueller Verteilungsfunktion $\mathcal{N}\{\mu_i, \sigma_i^2\}$ ist ebenfalls Gauß-verteilt. Erwartungswerte und Varianzen addieren sich [60]:

$$z = \sum_{\forall i} x_i \sim \mathcal{N}\left\{\sum_{\forall i} \mu_i, \sum_{\forall i} \sigma_i^2\right\} \quad (2.37)$$

Die Multiplikation mit einer Konstanten c zeigt, dass der Erwartungswert ebenfalls mit c skaliert, während die Varianz dies mit c^2 tut. Daher bleibt das SNR durch die Multiplikation mit einer Konstanten stets konstant [60].

$$z = c \cdot x \sim \mathcal{N}\{c \cdot \mu_x, c^2 \cdot \sigma_x^2\} \quad (2.38)$$

$$\text{SNR}_z = \frac{\mu_z}{\sigma_z} = \frac{c\mu_x}{\sqrt{c^2\sigma_x^2}} = \frac{\mu_x}{\sigma_x} = \text{SNR}_x \quad (2.39)$$

Wird eine Menge an Zufallszahlen x_i mit einer Funktion K gefaltet, so gilt für das Ergebnis $z_{i'}$ nach Gleichung 2.38 und 2.37:

$$z = K \otimes x \quad (2.40)$$

$$z_{i'} = \sum_{\forall i} K_i x_{i'-i} \sim \mathcal{N} \left\{ \sum_{\forall i} K_i \mu_{i'-i}, \sum_{\forall i} K_i^2 \sigma_{i'-i}^2 \right\} \quad (2.41)$$

$$\begin{aligned} z_{i'} &\sim \mathcal{N} \left\{ [K \otimes \mu]_{i'}, [K^2 \otimes (\sigma^2)]_{i'} \right\} \\ z &\sim \mathcal{N} \left\{ K \otimes \mu, (K^2) \otimes (\sigma^2) \right\} \end{aligned} \quad (2.42)$$

2.5.3. Zusammenhang von Poisson- und Gaußverteilung

Die Poisson-Verteilung geht mit zunehmendem Erwartungswert (Anzahl zu erwartender Photonen) in die Gauß-Verteilung mit wachsender Breite über. Diese Näherung ist schon ab 100 Photonen sehr gut [50, 60, 61].

Die Näherung einer Poisson- durch eine Gaußverteilung ermöglicht es, die Differenz zweier Zufallsvariablen anstatt mit der Skellam-Verteilung (s. Gl. 2.35) wieder durch eine Gaußverteilung (s. Gl. 2.37) zu beschreiben. Eine statistische Auswertung eines Gaußverteilten Zufallsprozesses ist sehr gut mit einer Vielzahl an Lehrsätzen erforscht, während es zur (selten verwendeten) Skellam-Verteilung nur wenig Ansätze gibt.

2.5.4. Z-score

Um verschiedene Zufallsexperimente X_i mit verschiedenen Gauß-Verteilungen $\mathcal{N} \{ \mu_i, \sigma_i^2 \}$ miteinander vergleichen zu können, müssen die Verteilungsfunktionen *standardisiert* werden. Die Normalverteilung in Standardform ($\mathcal{N} \{ 0, 1 \}$) hat den Mittelwert 0 und die Varianz 1. Zufallsexperimente oder Gauß-Verteilungen werden wie folgt umgerechnet [60]:

$$z_i = \frac{x_i - \mu_i}{\sigma_i} \quad (2.43)$$

$$z_i \sim \frac{\mathcal{N} \{ \mu_i, \sigma_i^2 \} - \mu_i}{\sigma_i} = \frac{\mathcal{N} \{ 0, \sigma_i^2 \}}{\sigma_i} = \mathcal{N} \{ 0, 1 \} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} = \phi(x) \quad (2.44)$$

z_i wird im Folgenden als *z-score* bezeichnet und entspricht der Abweichung einer Zufallsvariable x_i vom Erwartungswert μ_i skaliert in der Standardabweichung σ_i . Die

Wahrscheinlichkeit, dass eine Zufallsvariable kleiner als z_{test} ist, das s.g. Gaußsche Fehlerintegral $\Phi(z_{test})$, ist:

$$\Phi(z_{test}) = \int_{-\infty}^{z_{test}} \phi(z) dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{z_{test}} e^{-\frac{z^2}{2}} dz \quad (2.45)$$

Durch die Standardisierung lässt sich diese auf jede beliebige Gauß-Verteilung anwenden: „Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß eine nach $N(\mu, \sigma^2)$ verteilte zufällige Variable einen Wert annimmt, der mindestens a) um das k-fache der Standardabweichung σ kleiner [...] größer als μ ist, [...] ist $\Phi(-k)$ “ ([60] S. 101). Die Wahrscheinlichkeit p , dass eine Zufallsvariable x um mindestens das k-fach der Standardabweichung vom Mittelwert abweicht ist demnach $2\Phi(-k)$. Die Größe k ist hierbei identisch mit einer maximal erlaubten z-score z_{test} .

$$p(|x - \mu| < k\sigma) = 2\Phi(-k) \quad (2.46)$$

$$p\left(\frac{|x - \mu|}{\sigma} < k\right) = p(|z| < z_{test}) = 2\Phi(-z_{test}) \quad (2.47)$$

Das Gaußsche Fehlerintegral in Gleichung 2.45 kann durch die Gaußsche Fehlerfunktion $\text{erf}(x)$ ausgedrückt werden, welches als Lookup-Tabelle vorliegt [50]:

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt = 2\Phi(\sqrt{2}x) \quad (2.48)$$

Mit Gl.2.47 folgt schließlich die Wahrscheinlichkeit, dass der z-score einer Zufallsvariable nicht größer z_{test} ist, und die Zufallsvariable somit nicht weiter als das z_{test} -fache der Standardabweichung vom Erwartungswert entfernt ist.

$$p(|z| < z_{test}) = \text{erf}\left(\frac{z_{test}}{\sqrt{2}}\right) \quad (2.49)$$

Gleichung 2.49 ist für einige ausgewählte z_{test} berechnet und in Tabelle 2 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit in hohem Maße nichtlinear ist und sehr steil gegen 0 bzw. 1 konvergiert. Ob eine Zufallsvariable einer zur Disposition stehenden Verteilungsfunktion unterliegt, kann durch die Fehlerfunktion abgeschätzt werden.

2.6. Bewegungsdetektion

Eine Bewegung ist die Ortsänderung eines Objektes, sodass sich auch die Position des Objektes in einer Abbildung ändert. Sich nicht bewegendende Objekte werden hierbei oft

z_{test}	$p(z < z_{test})$ $= \text{erf}\left(\frac{z_{test}}{\sqrt{2}}\right)$	Chance das $ z > z_{test}$ $1 : (1 - \text{erf}\left(\frac{z_{test}}{\sqrt{2}}\right))$
1	0.68	1 : 3
2	0.954	1 : 22
3	0.9973	1 : 370
4	0.999937	1 : 15 Tausend
5	0.99999943	1 : 1,7 Millionen
6	0.9999999980	1 : 506 Millionen
7	0.999999999974	1 : 390 Milliarden
8	0.999999999999988	1 : 818 Billionen

Tabelle 2: Die gaußsche Fehlerfunktion erf zeigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zufallsvariable weiter als das z_{test} -fache der Standardabweichung vom Erwartungswert entfernt liegt. Der Funktionsverlauf ist nichtlinear.

als Hintergrund oder *stationär* bezeichnet^[11]. Ein Standardverfahren zur Detektion von Bewegung ist die Frame Difference Method (FDM). Hierbei wird die Differenz $\Delta(\vec{r})$ zweier Bilder $D_{1,2}(\vec{r})$ gebildet:

$$\Delta(\vec{r}) = D_1(\vec{r}) - D_2(\vec{r}) \quad (2.50)$$

Die Differenz kann pixelweise analysiert werden. Zeigen beide Bilder an der Position \vec{r} den Hintergrund, so ist $\Delta(\vec{r}) = 0$. Verändert sich hingegen das Objekt in \vec{r} , so ändert sich auch die gemessene Helligkeit im Bild, sodass $\Delta(\vec{r}) \neq 0$ und damit Bewegung am Ort \vec{r} nachgewiesen werden kann. Die Ansprüche an die beiden Ausgangsbilder $D_{1,2}$ sind [55] und [RF5]:

- A) Die Beleuchtung des Objektes muss konstant, jedoch nicht homogen sein. Andernfalls beinhaltet das Differenzbild die Änderung der Helligkeit. Selbst bei stationären Objekten würde dann eine Bewegung detektiert.
- B) Die abbildende Optik muss ihren Fokus beibehalten. Andernfalls verändert sich selbst ein stationäres Objekt durch die Veränderung des abbildenden PSF. Diese Veränderung wird als Bewegung detektiert.
- C) Die Anzahl an Photonen muss hoch genug sein, sodass das Signal Δ nicht im Photonenrauschen untergeht. Je höher das SNR, desto geringere Bewegungen können detektiert werden und desto zuverlässiger ist die FDM.

¹¹Dies sollte nicht mit dem Begriff des Hintergrundes (engl.: Background) in der Mikroskopie verwechselt werden. Dort ist der Hintergrund eine Ebene ober- oder unterhalb des Fokus, welcher unscharf abgebildet wird und dadurch den Kontrast des Objektes in Fokus reduziert.

3. Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung

3.1. Moiré-Effekt

Die Grundlage für die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) ist der Moiré-Effekt der durch Abb. 3.1 ausführlich erläutert wird. Als Objekt dient hierbei ein Spokes (Speichen) Target. Es beinhaltet eine Vielzahl von Gitterperioden in allen Richtungen (b). Als Moiré-Effekt bezeichnet man die Überlagerung zweier Gitterstrukturen mit ähnlicher Periode und Richtung. Hierfür dient die strukturierte Beleuchtung (c) des Objektes, welche die genannten Interferenzen erzeugt (grüner Kreis in f). Die Interferenz beinhaltet Summen- und Differenzfrequenzen, wobei letztere hier von besonderem Interesse sind, da durch sie eine (unbekannte) beliebig hochfrequente Objektstruktur, durch die Überlagerung mit einer (bekannten) Referenzstruktur ähnlicher Frequenz moduliert werden kann. Der Vergleich mit einer klassischen homogenen Beleuchtung (a und d) zeigt deutlich das Auftreten grober Interferenzen Aufgrund der inhomogenen Beleuchtung. Ist eine Hochfrequenz nicht detektierbar, da sie über der Abtastrate oder gar dem Tiefpass des Messsystems liegt, so kann durch den Moiré Effekt immerhin die Differenzfrequenz gemessen werden. Dies wird durch die simulierte Abbildung mit der PSF (e) gezeigt. Das Weitfeld-Bild (g) ist durch das Abbe-Limit begrenzt (roter Kreis), sodass keine Informationen darüber hinaus abgebildet werden. Das SIM-Bild hingegen (i) überträgt die Differenzfrequenz von Objekten jenseits des Abbe-Limits (s. grüner Kreis). Durch die Anisotropie des Beleuchtungsmusters ist auch der Moiré Effekt anisotrop, sodass eine Drehung des Musters notwendig ist um Isotropie näherungsweise zu gewährleisten. Ist die Referenzstruktur ausreichend bekannt, so kann die originale Hochfrequenz, aus der Differenzfrequenz rekonstruiert werden. Hierfür müssen mehrere SIM-Bilder mit verschobenem Beleuchtungsgitter aufgenommen werden. Dies führt zu einer Variation im Interferenzmuster (h), welche die Rekonstruktion ermöglicht.

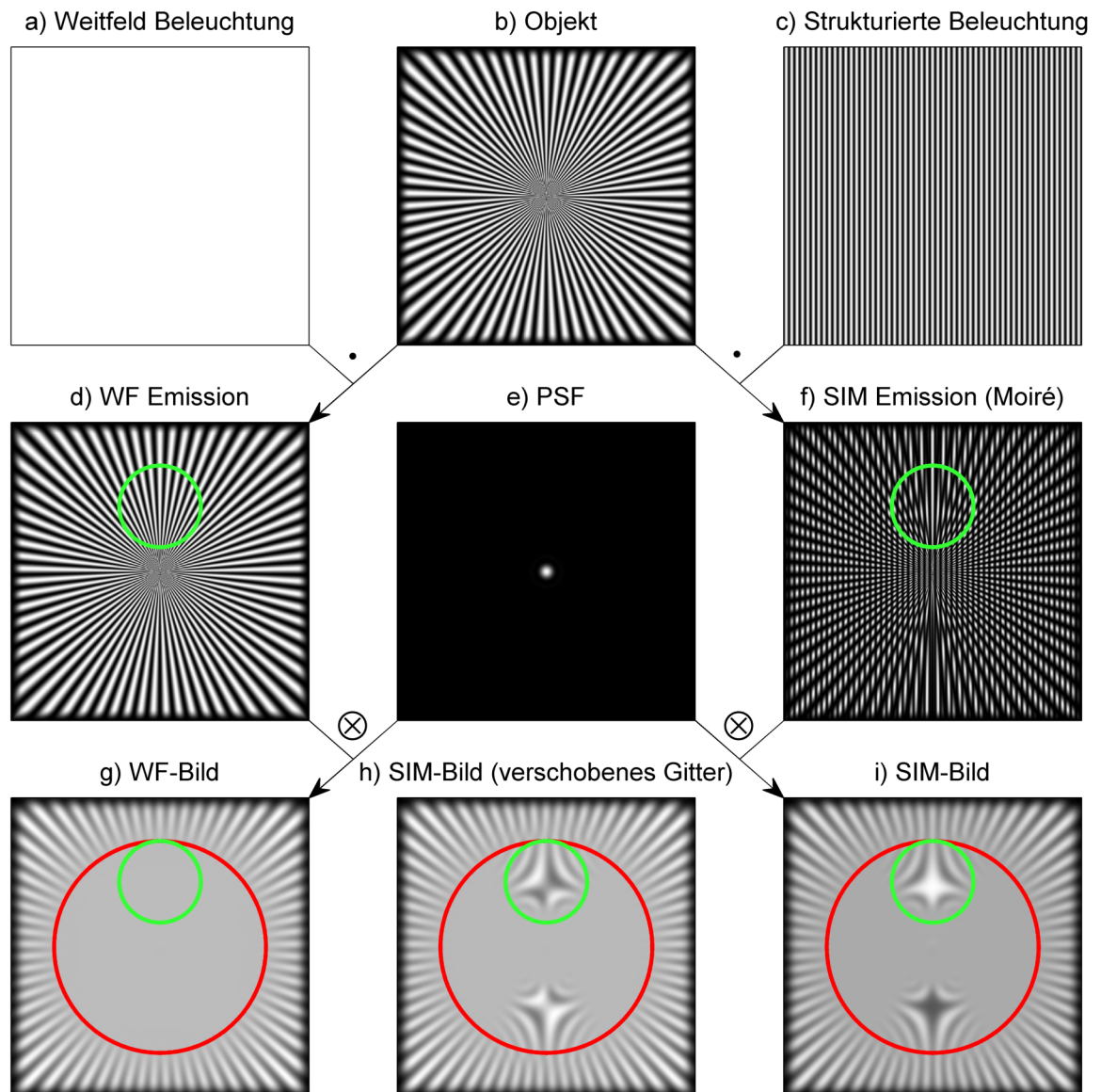


Abbildung 3.1: Die Überlagerung zweier ähnlicher Objektstrukturen führt zur Bildung von groben Interferenzstrukturen, welche in einem Mikroskop besser abgebildet werden können, als die Originale.

3.2. Bildaufnahme und -rekonstruktion

3.2.1. 3-Strahl Interferenz

Für die Anregungsintensität I gilt für SIM Rekonstruktionen üblicherweise [62]:

- a) die Summe endlich vieler harmonischer Funktionen zu sein
- b) für die Aufnahme 3-dimensional Objekte, in einen axialen $I_m(z)$ und lateralen Anteil $J_m(\vec{r}_{lat})$ separierbar zu sein:

$$I(\vec{r}) = I(\vec{r}_{lat}, z) = \sum_m (I_m(z) \cdot J_m(\vec{r}_{lat})) \quad (3.1)$$

- c) beim Fokussieren des Objektes diesem zu folgen und nicht stationär am Objekt zu bleiben.

Bedingung a) wird hierbei sichergestellt, indem zwei (2D-SIM) oder drei (3D-SIM) kohärente Laserstrahlen in der hinteren Fokalebene des Objektivs fokussiert werden^[12]. Jeder dieser Strahlen $a \in \{-1; 0; 1\}$ ist daher eine ebene Welle E_a in der Probe:

$$E_a(\vec{r}, t) = \hat{E}_a \cdot e^{i(\vec{k}_a \vec{r} - \omega t - \phi_a)} \quad (3.2)$$

In der Probe interferieren die Strahlen. Für eine vollständige Interferenz ist es notwendig das die Polarisation aller Strahlen parallel zueinander ist. Ist dies gegeben, kann das elektrische Feld skalar betrachtet werden.

$$I(\vec{r}, t) = \left| \sum_a E_a(\vec{r}, t) \right|^2 = \sum_a E_a(\vec{r}, t) \cdot \sum_{a'} E_{a'}^*(\vec{r}, t) \quad (3.3)$$

$$= \sum_{a, a'} \hat{E}_a \hat{E}_{a'} \cdot e^{i[(\vec{k}_a - \vec{k}_{a'}) \vec{r} - (\phi_a - \phi_{a'})]} \quad (3.4)$$

$$I(\vec{r}) \stackrel{A.4}{=} \sum_n L_n \cdot e^{i\vec{k}_n \vec{r}} \cdot e^{i\phi_n} \quad (3.5)$$

$$\tilde{I}(\vec{k}) = \sum_n L_n \cdot \delta(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot e^{i\phi_n} \quad (3.6)$$

Das Interferenzmuster ist die Summe stehender Wellen mit Intensität L_n , Gittervektoren \vec{k}_n und individueller Phase ϕ_n . Diese werden als SIM-Ordnungen bezeichnet. Es ist ersichtlich, dass Gittervektor und Phasen des Beleuchtungsmusters unabhängig von-

¹²Die experimentelle Realisierung ist in Abschnitt 3.4 detailliert erklärt

einander verändert werden können. Die SIM-Ordnungen ergeben sich ebenfalls aus Gl. 3.3 als Autokorrelation:

$$\tilde{I}(\vec{k}) = \left[\left\{ \sum_a \tilde{E}_a(\vec{k}, t) \right\} \otimes \left\{ \sum_a \tilde{E}_a^*(-\vec{k}, t) \right\} \right] (\vec{k}) \quad (3.7)$$

$$= \left[\left\{ \sum_a \tilde{E}_a(\vec{k}, t) \right\} \star \left\{ \sum_a \tilde{E}_a(\vec{k}, t) \right\} \right] (\vec{k}) \quad (3.8)$$

Abbildung 3.2 zeigt die 3 Beleuchtungsstrahlen ($\tilde{E}_{1,0,-1}$) als Punkte auf der Ewaldkugel (links, oben in gelb). Zusätzlich sind die komplex konjugierten ($\tilde{E}_{1,0,-1}^*$) dargestellt, mit deren Hilfe die SIM-Ordnungen als Faltung konstruiert werden kann (Gl. 3.7). Es entstehen 7 verschiedene SIM-Ordnungen (rechts in orange dargestellt) an 5 verschiedenen lateralen Frequenzen. Die zentrale SIM-Ordung entspricht einer homogenen Weitfeld Beleuchtung.

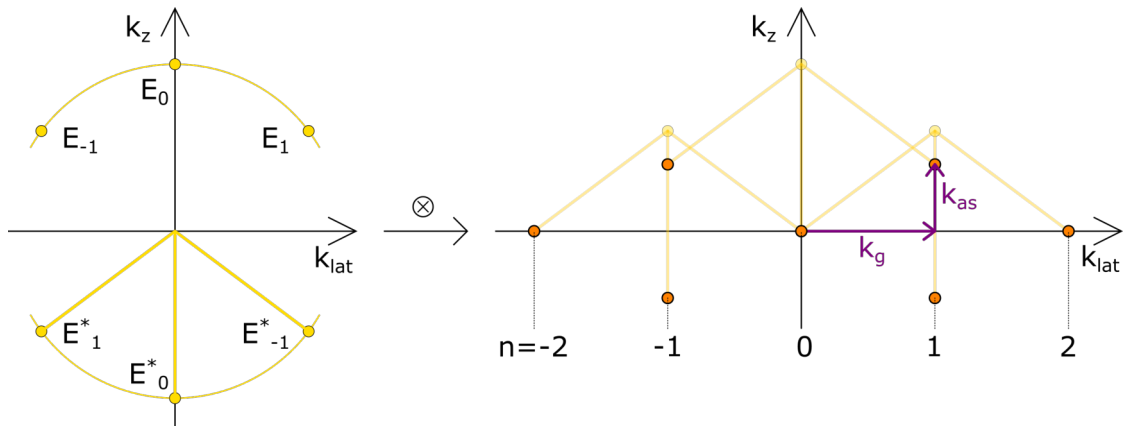


Abbildung 3.2: Drei Beleuchtungsstrahlen in 3D-SIM (links oben/ gelb) interferieren zu 7 SIM-Ordnungen (rechts/ orange)

3.2.2. SIM Detektions-OTF

Die idealen Positionen der Beleuchtungsstrahlen sind in Abb. 3.2 dargestellt. Der zentrale Strahl \tilde{E}_0 ist auf der optischen Achse und die anderen beiden Strahlen $\tilde{E}_{\pm 1}$ symmetrisch an der Seite. Eine Verschiebung des Beleuchtungsgitters ist an eine gegenläufige Änderung der Phase in den beiden äußeren Beleuchtungsstrahlen gekoppelt (s. Abschnitt A.2). Der mittlere Strahl bleibt unverändert und hat stets die globale Phase ϕ_0 .

Dies führt dazu, dass die beiden Subordnungen in der ± 1 . SIM-Ordnung stets mit der gleichen Phasen moduliert sind. Dies ist ausführlich in Tabelle 3 in Abschnitt A.4 gezeigt. Diese Modulation ist aber unabdingbar um die einzelnen SIM-Ordnungen von-

einander zu trennen und um ihre individuelle Frequenzverschiebung \vec{k}_n rückgängig zu machen (s. Abschnitt 3.2.5). Aufgrund der Symmetrie unterscheiden sich die beiden Subordnung ausschließlich in ihrer axialen Komponente \vec{k}_{as} . Bedingung c) gewährleistet, dass diese axiale Frequenzverschiebung schon durch die Aufnahme selbst geschieht [13]. Für die verbliebene - identische - laterale Frequenzverschiebung müssen beide Ordnungen nicht voneinander getrennt werden [62]. Die OTF ist demnach abhängig von der Ordnung auf die sie wirkt. Da das Beleuchtungsmuster ebenfalls dem Abbe-Limit unterliegt, kann die axiale Verschiebung \vec{k}_{as} nicht größer als die axiale Auflösung des Objektivs sein. SIM kann daher das axiale Auflösungsvermögen gegenüber herkömmlichen Mikroskopen verdoppeln^[14] [29].

$$\tilde{h}_n(\vec{k}) = \begin{cases} \tilde{h}(\vec{k}), & \text{für } n = 0 \text{ und } \pm 2 \\ \tilde{h}(\vec{k} + \vec{k}_{as}), & \text{für } n = \pm 1 \end{cases} \quad (3.9)$$

Abbildung 3.3 visualisiert die klassische OTF \tilde{h} (orange), sowie die axial verschobene SIM-OTF \tilde{h}_1 aus Gl. 3.9. Eine alternative Visualisierung ist in Abb. A.1 in Abschnitt A.5 dargestellt.

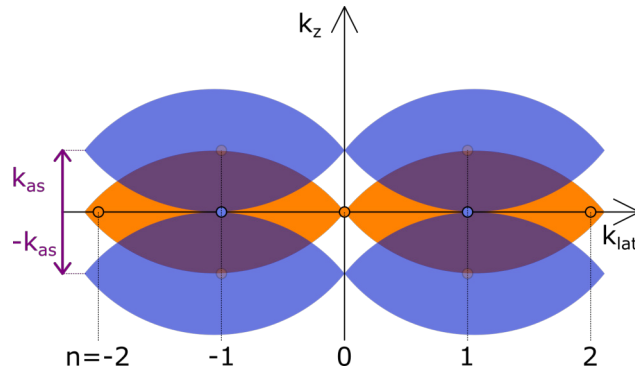


Abbildung 3.3: Die Weitfeld OTF \tilde{h} (orange) wirkt in der Detektion auf die SIM-Ordnungen 0 und ± 2 . Die ± 1 . Ordnung benötigt eine axial Verschobene Detektions-OTF (lila)

3.2.3. Laterale und axiale Abtastung

Die notwendige Abtastung richtet sich nach der Übertragungsfunktion des Systems (hier: OTF). Gl. 3.9 und Abb. 3.3 zeigen hierbei, dass die maximal übertragene laterale

¹³Die laterale Frequenzverschiebung ebenfalls bereits durch die Aufnahme rückgängig zu machen ist möglich aber unpraktisch [63].

¹⁴Durch die Stokes-Verschiebung liegt die Verbesserung knapp über zwei (s. Abschnitt 3.2.8)

Frequenz eines SIM-Rohbildes identisch zu der eines Weitfeld Bildes ist. Die laterale Hochauflösung entsteht erst nach der SIM-Aufnahme, sodass diese mit der gleichen lateralen Abtastung (Pixelgröße der Kamera) wie eine Weitfeld Aufnahme erfolgen kann. Axial hingegen ist die OTF um $\pm \vec{k}_{as}$ verschoben, sodass die axiale Hochauflösung schon während der Detektion vorliegt. Durch die Verdoppelung der axialen Auflösung in 3-Strahl-SIM, muss der 3D z-scan bei der Aufnahme ebenfalls doppelt so fein sein wie bei einer Weitfeld Aufnahme.

Ein 2-Strahl-SIM verfügt nicht über die ± 1 . SIM-Ordnung und damit auch nicht über die axial verschobene OTF $\tilde{h}_1(\vec{k})$. Daher kann eine 3D-Aufnahme mit 2-Strahl-SIM mit der klassischen axialen Weitfeld Abtastung erfolgen.

3.2.4. Aufnahme mehrere Phasen

Mit Hilfe der inkohärenten Abbildung in Gl. 2.19 zeigt die Bildaufnahme im Frequenzraum, dass es nun möglich ist, Frequenzen zu verschieben, bevor sie den Tiefpass der OTF bei der Abbildung durchlaufen müssen:

$$\tilde{D}(\vec{k}) = [\tilde{I} \otimes \tilde{\varrho}] (\vec{k}) \cdot \tilde{h}(\vec{k}) \quad (3.10)$$

$$\tilde{D}(\vec{k}) \stackrel{Gl. 3.6}{=} \left[\left(\sum_n L_n \cdot \delta(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot e^{i\phi_n} \right) \otimes \tilde{\varrho} \right] (\vec{k}) \cdot \tilde{h}(\vec{k}) \quad (3.11)$$

$$\tilde{D}(\vec{k}) \stackrel{c) \text{ und } [62]}{=} \sum_n L_n \cdot e^{i\phi_n} \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (3.12)$$

Da stets die Summe aller SIM-Ordnungen abgebildet wird, kann die individuelle Frequenzverschiebung \vec{k}_n nicht korrigiert werden. Die individuelle Phase jeder SIM-Ordnung $e^{i\phi_n}$ ermöglicht es ein Gleichungssystem aufzustellen und die einzelnen Ordnungen voneinander zu *separieren*. Hierfür müssen mehrere Rohbilder D_m mit verschiedener Phase $\phi_{m,n}$ aufgenommen werden. Die Anzahl der Rohbilder wird im Folgenden als m_{ges} bezeichnet. Die gesamte Aufnahme-prozedur von SIM ist in Abb. A.2 (s. Anhang A.6) dargestellt.

$$\tilde{D}_m(\vec{k}) = \sum_n \underbrace{e^{i\phi_{m,n}}}_{M_{mn}} \cdot \underbrace{L_n \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k})}_{\tilde{\Omega}_n(\vec{k})} \quad (3.13)$$

$$\vec{\tilde{D}}(\vec{k}) = \mathbf{M} \cdot \vec{\tilde{\Omega}}(\vec{k}) \quad (3.14)$$

Die 2D-Matrix \mathbf{M} wird als *Mixing Matrix* bezeichnet und enthält die Phasen $\phi_{m,n}$ die jede SIM-Ordnung $\tilde{\Omega}_n$ im m-ten Bild trägt.

3.2.5. Bildrekonstruktion

Werden mindestens n linear unabhängige Bilder D_m aufgenommen, so kann die Mixing Matrix invertiert werden und die einzelnen SIM-Ordnungen $\tilde{\Omega}_n(\vec{k})$ *separiert* werden. Werden mehr Bilder als SIM-Ordnungen aufgenommen, so erfolgt die Invertierung als Moore-Penrose-Pseudoinverse [47, 64].:

$$\vec{\tilde{\Omega}}(\vec{k}) = \mathbf{M}^{-1} \cdot \vec{D}(\vec{k}) \quad (3.15)$$

$$\tilde{\Omega}_n(\vec{k}) \stackrel{Gl. 3.13}{=} L_n \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (3.16)$$

Anschließend folgt die Verschiebung der einzelnen Ordnungen um die jeweilige Frequenzverschiebung \vec{k}_n rückgängig zu machen:

$$\tilde{\Omega}_n(\vec{k} + \vec{k}_n) = L_n \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k}) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k} + \vec{k}_n) \quad (3.17)$$

Nach dem Verschieben der Ordnung enthalten diese eine klassische Aufnahme, jedoch mit einer lateral verschobenen *effektiven* OTF $h_n(\vec{k} + \vec{k}_n)$. Die OTF geht damit über das Abbe-Limit hinaus, wodurch die Hochauflösung entsteht (s. Abb. 3.4). Je kleiner der Gittervektor \vec{k}_n , desto weiter kann die effektive OTF in den eigentlich unzugänglichen Bereich über dem Abbe-Limit vordringen. Bemerkenswert ist hierbei das die 0. Ordnung $\tilde{\Omega}_{n=0}(\vec{k})$ das Bild einer klassischen Weitfeld Aufnahme ist.

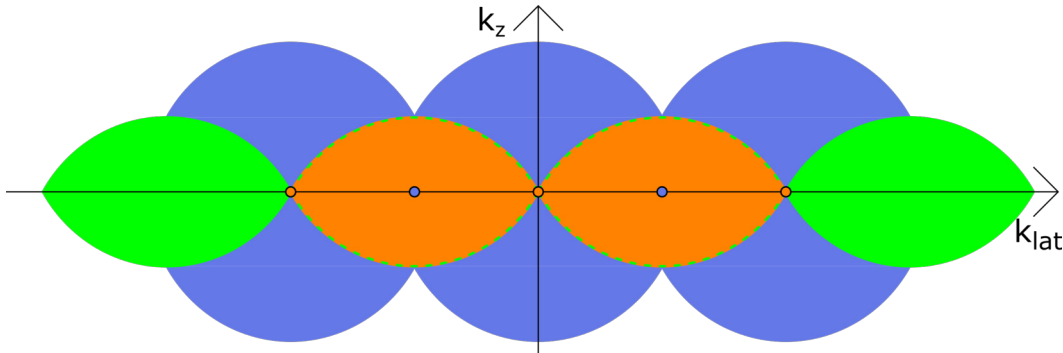


Abbildung 3.4: Weitfeld (orange): OTF besitzt laterale und axiale Grenzfrequenz (Abbe-Limit), sowie den missing cone. 2D-SIM (grün): verdoppeltes laterales Abbe-Limit. 3D-SIM (lila): verdoppeltes axiales Abbe-Limit und geschlossener missing cone.

Da die laterale Auflösungssteigerung nicht isotrop ist, sondern vorwiegend in Richtung der Gittervektoren \vec{k}_g erfolgt (s. 3.1), ist es notwendig die oben beschriebene Prozedur

in mehreren (zumeist 3) Gitterrichtungen vollständig zu wiederholen. Dabei wird das Gitter um 60° bzw. 120° gedreht (s. Abb. 3.5). Für maximalen Kontrast im Beleuchtungsmuster muss dabei auch die lineare Polarisation gedreht werden, sodass man von einer *azimuthalen Polarisation* im Gesamtsystem spricht. Diese Drehung kann aktiv [40] oder passiv [RF2] erfolgen.

Um aus allen SIM-Ordnungen (inklusive der verschiedenen Richtungen) ein einzelnes hochaufgelöstes Bild J zu bekommen, müssen die einzelnen Ordnungen noch kombiniert werden. Um in Überlappbereichen das beste SNR zu gewährleisten wird folgender gewichteter Mittelwert (engl.: weighted average) verwendet [47]^[15]:

$$\tilde{J}_{wa}(\vec{k}) = \frac{\sum_n \tilde{h}_n(\vec{k} + \vec{k}_n) \tilde{\Omega}_n(\vec{k} + \vec{k}_n)}{\sum_n \tilde{h}_n(\vec{k} + \vec{k}_n)} \quad (3.18)$$

Eine abschließende Wiener-Entfaltung ist - durch die bekannte OTF - möglich [47].

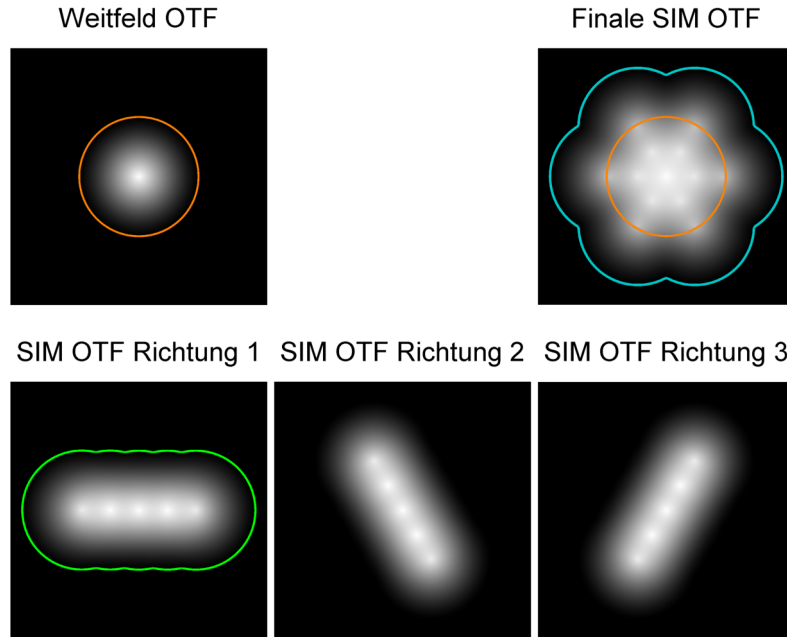


Abbildung 3.5: Oben links: Weitfeld OTF in der lateralen Ebene. Das Abbe-Limit ist als orangefarbener Kreis gekennzeichnet. Unten links: Die SIM-OTF hat einen deutlich größeren Übertragungsbereich. Dieser ist jedoch anisotrop, sodass das Beleuchtungsmuster - und damit die effektive-OTF gedreht werden müssen (unten Mitte und rechts). Oben rechts: Die Kombination der 3 Richtungen ergibt die Finale SIM-OTF, der Übertragungsbereich (blau) das Abbe-Limit (orange) deutlich überschreitet.

¹⁵Das Rauschen ist der Anschaulichkeit halber ausgelassen. Eine ausführliche Herleitung findet sich in [47]

3.2.6. Ideale SIM-Beleuchtung

Um das SNR in den einzelnen SIM-Ordnungen zu maximieren und um kein Gitter in die Fluorophorverteilung zu bleichen, sollte der Phasenschritt $\phi_{schritt}$ stets gleich sein:

$$\phi_{m,n} = m \cdot n \cdot \phi_{schritt} + \phi_0 \quad (3.19)$$

$$\text{mit: } \phi_{schritt} = \frac{2\pi}{m_{ges}} \quad (3.20)$$

$$\vec{k}_n = n\vec{k}_g \quad (3.21)$$

Hieraus ergibt sich für 3-Strahl SIM ($n \in \{-2; -1; 0; +1; +2\}$, $m \in \{0; 1; 2; 3; 4\}$ und $m_{ges} = 5$) die Mixing Matrix \mathbf{M} und deren Inverse \mathbf{M}^{-1} zu^[16]:

$$\mathbf{M} = e^{i\phi_{m,n}} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & 1 & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} \\ e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & 1 & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} \\ e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & 1 & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} \\ e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & 1 & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} \end{bmatrix} \quad (3.22)$$

$$\mathbf{M}^{-1} \stackrel{\text{Abschnitt A.7}}{=} \frac{e^{-i\phi_{n,m}}}{m_{ges}} = \begin{bmatrix} 1 & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} \\ 1 & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} \\ 1 & e^{i \cdot 3\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 1\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 4\phi_{schritt}} & e^{i \cdot 2\phi_{schritt}} \end{bmatrix} \cdot \frac{1}{5} \quad (3.23)$$

Es ist insbesondere zu erkennen, dass die 0. Ordnung (Reihe in orange gefärbt) lediglich aus der Summe aller Rohbilder gebildet wird.

3.2.7. Experimentelle Fehler der SIM-Beleuchtung

Die Rekonstruktion von experimentellen SIM-Rohdaten - mit all ihren Ungenauigkeiten und Fehlern - ist auf eine Vorprozessierung der Daten, sowie eine sehr genaue Parameterschätzung angewiesen. Laserfluktuationen, Drift des Objektes, Gitterkonstante und -richtung \vec{k}_g , Gitterphase $\phi_{m,n}$, globale Phase ϕ_0 und die *order strength* kann durch Software korrigiert bzw. geschätzt werden [47, 65].

¹⁶Global Phase $\phi_0 = 0$.

3.2.8. Auflösungslimit

Das kleinstmögliche Beleuchtungsgitter ist ebenfalls durch das Abbe-Limit begrenzt, sodass gilt:

$$k_{g_{max}} = \frac{k_{Abbe_{lat}}(\lambda_{ex}, NA_{ex})}{2} \quad (3.24)$$

$$k_{as_{max}} = k_{Abbe_{ax}}(\lambda_{ex}, NA_{ex}) \quad (3.25)$$

Die durch SIM maximal übertragbare Frequenz ergibt sich daher zu:

$$k_{SIM_{lat}} = k_{Abbe_{lat}}(\lambda_{ex}, NA_{ex}) + k_{Abbe_{lat}}(\lambda_{em}, NA_{em}) \quad (3.26)$$

$$k_{SIM_{ax}} = k_{Abbe_{ax}}(\lambda_{ex}, NA_{ex}) + k_{Abbe_{ax}}(\lambda_{em}, NA_{em}) \quad (3.27)$$

Liegen Anregungs- und Emissionswellenlänge der verwendeten Fluorophore nicht zu weit auseinander (Stokes-Verschiebung), so ist die Auflösung von SIM näherungsweise doppelt so hoch wie im Weitfeld Mikroskop.

$$k_{SIM_{lat}} \approx 2 \cdot k_{Abbe_{lat}}(\lambda_{em}, NA) \quad (3.28)$$

$$k_{SIM_{ax}} \approx 2 \cdot k_{Abbe_{ax}}(\lambda_{em}, NA) \quad (3.29)$$

3.3. Bewegungsartefakte

3.3.1. Bildaufnahme und -rekonstruktion bewegter Objekte

Der für die Rekonstruktion notwendige Übergang von der Aufnahme mehrerer Rohbilder D_m (Gl. 3.13) zu einem Gleichungssystem (Gl. 3.14), beschrieben durch die Mixing Matrix \mathbf{M} , setzt eine stationäre Probe $\varrho(\vec{r})$ voraus. Liegt jedem Rohbild jedoch eine andere Fluorophorverteilung $\varrho_m(\vec{r})$ zugrunde, so führt dies zu Fehlern in der Rekonstruktion, sowie in der Parameterschätzung. Das final hochaufgelöste Bild besitzt Artefakte, die sich nur schwer vom (unbekannten) Objekt unterscheiden lassen. Ausgehend von Gl. 3.13 gilt:

$$\tilde{D}_m(\vec{k}) = \sum_n \underbrace{e^{i\phi_{m,n}}}_{M_{mn}} \cdot L_n \cdot \tilde{\varrho}_m(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (3.30)$$

Die durchschnittliche Fluorophorverteilung $\bar{\varrho}(\vec{r})$ wird definiert zu:

$$\bar{\varrho}(\vec{r}) = \frac{\sum_m \varrho_m(\vec{r})}{m_{ges}} \quad (3.31)$$

Die sich verändernde Fluorophorverteilung $\varrho_m(\vec{r})$ kann demnach als Summe eines stationären (durchschnittlichen) Objektes $\bar{\varrho}(\vec{r})$ und einer veränderlichen Komponente $\varrho_m^\delta(\vec{r})$ aufgefasst werden:

$$\varrho_m(\vec{r}) = \bar{\varrho}(\vec{r}) + \varrho_m^\delta(\vec{r}) \quad (3.32)$$

Demnach kann auch die Rekonstruktion als Summe einer stationären (und damit korrekten) Rekonstruktion sowie eines Fehlerterms geschrieben werden:

$$\tilde{D}_m(\vec{k}) = \sum_n M_{mn} \cdot \underbrace{L_n \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k})}_{\tilde{\Omega}_n(\vec{k})} + \sum_n M_{mn} \cdot \underbrace{L_n \cdot \tilde{\varrho}_m^\delta(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k})}_{\tilde{\Omega}_{n,m}^\delta(\vec{k})} \quad (3.33)$$

$$\vec{\tilde{D}}(\vec{k}) = \mathbf{M} \begin{pmatrix} \tilde{\Omega}_{-2}(\vec{k}) \\ \tilde{\Omega}_{-1}(\vec{k}) \\ \cdot \\ \cdot \\ \tilde{\Omega}_2(\vec{k}) \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \sum_n M_{0n} \tilde{\Omega}_{n,-2}(\vec{k}) \\ \sum_n M_{1n} \tilde{\Omega}_{n,-1}(\vec{k}) \\ \cdot \\ \cdot \\ \sum_n M_{4n} \tilde{\Omega}_{n,2}(\vec{k}) \end{pmatrix} \quad (3.34)$$

$$\mathbf{M}^{-1} \vec{\tilde{D}}(\vec{k}) = \underbrace{\begin{pmatrix} \tilde{\Omega}_{-2}(\vec{k}) \\ \tilde{\Omega}_{-1}(\vec{k}) \\ \cdot \\ \cdot \\ \tilde{\Omega}_2(\vec{k}) \end{pmatrix}}_{\text{stationäre Rekonstruktion}} + \underbrace{\mathbf{M}^{-1} \begin{pmatrix} \sum_n M_{-2n} \tilde{\Omega}_{n,-2}(\vec{k}) \\ \sum_n M_{-1n} \tilde{\Omega}_{n,-1}(\vec{k}) \\ \cdot \\ \cdot \\ \sum_n M_{2n} \tilde{\Omega}_{n,2}(\vec{k}) \end{pmatrix}}_{\text{Artefakte}} \quad (3.35)$$

3.3.2. Ort von Bewegungsartefakten

Ort und Form der Artefakte können im Realraum untersucht werden. Hierfür gilt nach Gl. 3.35 für die n' -te SIM-Ordnung:

$$\sum_m M_{n'm}^{-1} D_m(\vec{r}) = \underbrace{\bar{\Omega}_{n'}(\vec{r})}_{\text{SIM-Ordnung}} + \underbrace{\sum_m M_{n'm}^{-1} \sum_n M_{mn} L_n}_{\text{Wichtungsfaktoren}} \cdot \underbrace{\left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right]}_{\text{Artefaktbereich}}(\vec{r}) \quad (3.36)$$

$$= \bar{\Omega}_{n'}(\vec{r}) + \Psi_{n'}(\vec{r}) \quad (3.37)$$

Der zweite Term zeigt, dass sich bewegende Probeninformation ϱ_m^δ nur im Bereich der PSF über das rekonstruierte Bild verteilt. Dies wird im Folgenden als *Artefaktbereich* bezeichnet. Dies hat zwei Folgen für den Zusammenhang zwischen Bewegung, Artefakten und deren Detektion.

1. Findet eine Bewegung ausschließlich in einem Teil des Bildes statt, so kann das SIM-Bild des restlichen Objektes trotzdem verwendet werden, da die PSF und somit die Artefakte dort hinreichend klein sind.
2. Wird eine Bewegung detektiert und lokalisiert, so kann der Bereich indem sich Artefakte bilden sehr genau vorhergesagt werden. Insbesondere können Bewegungsartefakte ausgeschlossen werden, wenn keine Bewegung detektiert wird.

Findet keine Bewegung statt ($\varrho_m^\delta(\vec{r}) = 0$) so verschwindet der zweite Term und die Rekonstruktion entspricht wieder Gl. 3.15.

3.3.3. Form von Bewegungsartefakten

Die Bewegungsartefakte $\Psi_{n'}$ aus Gl. 3.37 können umgeschrieben werden, indem man die Symmetrieeigenschaften der Ordnungen aus Abschnitt 3.2.6 berücksichtigt. Es ergibt sich (s. Abschnitt A.8):

$$\Psi_{n'}(\vec{r}) = e^{i\phi_0} \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[\underbrace{L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right]}_{\text{Weitfeld}}(\vec{r}) + \underbrace{2 \sum_{n>0} L_n \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot \cos(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}}) \right) \otimes h_n \right]}_{\text{SIM}}(\vec{r}) \right] \quad (3.38)$$

Die Artefakte lassen sich zerlegen in die Artefakte der klassischen Weitfeld Abbildung und die von SIM. Das Weitfeld Artefakt ist hierbei die Übertragung der Veränderung des Objektes ϱ_m^δ aus der Objekt in die Bildebene. Die Bewegung eines Objektes wird

somit als dessen „Faltungsspur“ sichtbar. Dies ist ein leicht zu erkennendes Artefakt. Zudem wird ausschließlich die Auflösung reduziert, während keine künstlichen Strukturen generiert werden.

Bei den SIM-Artefakten hingegen, wird das Objekt vor seiner Abbildung noch mit allen Beleuchtungsgittern moduliert. Diese eigentlich gewollte Modulation, wird durch die stetige Veränderung der Probe jedoch nicht wie sonst durch die SIM-Rekonstruktion entfernt. Das Beleuchtungsmuster wird demnach auf sich veränderte Objekte ϱ_m^δ aufgeprägt und in die SIM-Ordnungen transferiert. SIM Artefakte beinhaltet demnach das Beleuchtungsgitter in abgeänderter Form. Die SIM-Rekonstruktion verschiebt die n' -te Ordnung im Fourierraum zusätzlich um $-n'\vec{k}_g$, sodass der Moiré Effekt rückgängig gemacht wird. Da jedoch alle Gitter - und nicht nur das der Ordnung n' - aufgeprägt sind, wird durch die Verschiebung die Frequenz der aufgeprägten Gitter deutlich erhöht. Es entstehen künstliche Objektinformationen jenseits des Abbe-Limits, welche fälschlicherweise als Hochauflösung interpretiert werden können.

3.3.4. Korrektur von Bewegungsartefakten

Bewegungsartefakte können nur schwer behoben werden. Hierfür müsste die Bewegung des Teilchens gut gemessen werden können. Während dies für große Objekte (wie eine ganze Zelle) machbar erscheint, ist dies für kleine Details nur schwer möglich. Durch die Bewegung schlägt die Separation der Ordnungen im Bereich der Bewegung fehl und jede SIM-Ordnung n' enthält andere Ordnungen ($\sum_n M_{mn} \tilde{\Omega}_{nm}^\delta(\vec{k})$; s. Gl. 3.35). Um Bewegungsartefakte zu entfernen, müsste diese fehlgeschlagene Separation korrigiert werden.

3.3.5. Bisherige Ansätze

Nach Shao et al. treten Bewegungsartefakte erst dann auf, wenn die während der Belichtungszeit zurückgelegte Distanz des Objektes, größer ist als die (finale) Auflösung des Mikroskops [33]. Dieses Limit gilt für klassische Mikroskopie, bei der eine Bewegung des Objektes lediglich zu einer Spur im Bild führt. Dies bleibt unbemerkt, solange die Bewegung kleiner ist als die Auflösung. Die Rekonstruktion in SIM hingegen besteht aus mehreren komplexen Schritten, sodass Bewegungsartefakte eventuell schon bei langsameren Geschwindigkeiten entstehen (Gl. 3.38). Das Finden der maximalen Geschwindigkeit bis zu welcher sich Objekte artefaktfrei mit SIM abbilden lassen ist für die Forschung von großem Interesse. Dann wäre es möglich zu entscheiden, welche biomedizinischen Prozesse sich durch SIM mit hoher Qualität und Konfidenz abbilden lassen - und welche nicht. Ströhl et al. untersuchten das Auflösungsvermögen von 2D-

SIM an einem sich bewegenden Doppelspalt. Eine Anwendung auf 3D-SIM wurde nicht durchgeführt. Zusätzlich ist es unklar, ob die Resultate eines Doppelspalt auf andere Objekte angewandt werden können [41]. Durch die Untersuchung von Punktquellen - aus denen jedes komplexere Objekt bei einer inkohärenten Bildgebung zusammengesetzt ist - können generelle Zusammenhänge und Gesetze abgeleitet werden.

3.4. Experimenteller Aufbau

Abbildung 3.6 zeigt den Prototypen des fastSIM-Setups [RF2]. Zur Anregung der Fluorophore dient ein Laser mit passender Wellenlänge (s. Abschnitt 2.1.1). Der kollimierte Laserstrahl trifft auf ein Beugungsgitter in einer konjugierten Objektebene (I). Das Beugungsgitter kann hierbei direkt die Intensität (hohe Verluste) oder wie meist die Phase des Lichtes ändern. Das Beugungsgitter wird entsprechend verkleinert und in das Objekt abgebildet. Hierbei kann eine Filterung in einer Fourierebene (P) nötig sein, um Streulicht, unerwünschte Beugungsordnungen und (wenn nötig) die nullte Beugungsordnung gezielt zu unterdrücken. Das emittierte Licht wird über einen dichroitischen Strahlteiler von gestreutem Anregungslicht getrennt und durch die Tubuslinse auf eine Kamera abgebildet. Laserstrahl, Position und Orientierung des Gitters, sowie die Kamera und die z-stage sind miteinander synchronisiert. Um die Bilder möglichst schnell aufzunehmen wird im fastSIM-Setup mit einem Spatial Light Modulator (SLM) gearbeitet. Das Elyra S.1 ist dem fastSIM identisch, nur das es das Gitter nicht optoelektronisch sondern mechanisch verschiebt. Dies ist entsprechend langsamer. Die Rekonstruktion der SIM-Daten erfolgt mit der mitgelieferten Software ZEN (Zeiss). Die zum Einsatz kommenden Algorithmen sind in [47] detailliert beschrieben.

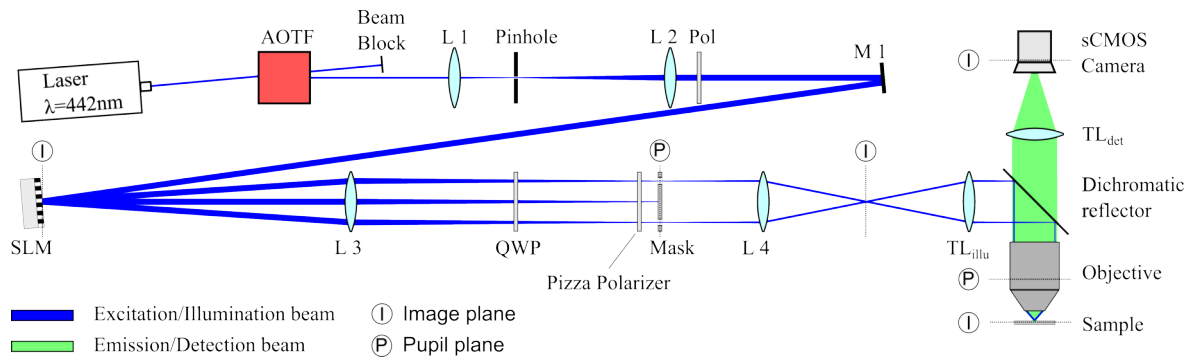


Abbildung 3.6: Experimenteller SIM-Aufbau Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF2], The Optical Society.

4. Der z-score: Ein photonenabhängiges Maß für Bewegung

4.1. Generierung unabhängiger Weitfeldbilder

Die Bewegung eines Objektes in SIM soll durch das Standardverfahren der Frame Difference Method (FDM) (s. Abschnitt 2.6) erfolgen. Keine der drei Bedingungen der FDM ist jedoch in SIM-Rohdaten erfüllt, weshalb eine Vorverarbeitung der Daten notwendig ist, bevor die FDM angewandt werden kann. Die Teilschritte A, B und C sind hierbei in Abb. 4.1 illustriert.

4.1.1. Schritt A - Pseudo-Weitfeld Bild

Das Beleuchtungsgitter wechselt nach der Aufnahme eines jeden Rohbildes. Ein einzelner Fluorophor kann demnach aus zwei Gründen verschwinden. Entweder, weil es genau in einem Minimum ($I_{min} = 0$) des Gitters liegt, sodass es nicht angeregt werden kann oder aber Aufgrund einer tatsächlich stattfindenden Bewegung zu einem anderen Ort. Es ist nicht möglich Anhand der Bilder zu entscheiden, welche der beiden Möglichkeiten real ist. Die einfachste Möglichkeit für eine Bewegungsdetektion wäre vor und nach jedem Rohbild ein klassisches Weitfeld Bild aufzunehmen. Dies genügt den Kriterien der FDM, stellt jedoch eine zusätzliche Belastung für die Probe dar. Zum einen wird das begrenzte Photonenbudget verschwendet und die Zelle bleicht eher. Zum anderen werden nun 17 statt 15 Bilder aufgenommen, sodass die Aufnahmedauer um 13% verlängert wird. Eine Lösung des Problems ohne die Aufnahme zusätzlicher Bilder ist erstrebenswert. Zudem können dadurch aufgenommene SIM-Daten rückwirkend auf Artefakte getestet werden.

Die Rekonstruktion von SIM-Daten für ein sich bewegendes Objekt erzeugt u.a. die klassische Weitfeld Ordnung $\Omega_0(\vec{r})$. Nach Gl. 3.15 und Gl. 3.17 ergibt sich:

$$\tilde{\Omega}_{n'=0}(\vec{k}) = \sum_{\forall m} M_{n'=0 \ m}^{-1} \cdot \tilde{D}_m(\vec{k}) \quad (4.1)$$

Für ideale Phasenschritte, die heutige Piezo-Stellelemente in guter und SLMs in sehr guter Näherung erreichen, sind die Koeffizienten der inversen mixing Matrix für die WF-Ordnung $M_{n'=0 \ m}^{-1}$ alle $\frac{1}{m_{ges}}$ (siehe Gl. 3.23):

$$\tilde{\Omega}_0(\vec{k}) = \frac{1}{m_{ges}} \sum_{\forall m} \tilde{D}_m(\vec{k}) = L_0 \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k}) \cdot \tilde{h}_0(\vec{k}) \quad (4.2)$$

Daher gilt, dass ein Pseudo-Weitfeld Bild aus der Summe aller Bilder gewonnen werden kann. Unter der Berücksichtigung der Bewegung des Objektes ergibt sich, dass dieses aus einer stationären Weitfeld Komponenten $\bar{\Omega}_{n'}$ und dem additiven lokal begrenzten Bewegungsartefakt $\Psi_{n'}$ besteht (siehe Abschnitt 3.3.2).

Es muss betont werden, dass das Pseudo-Weitfeld Bild eines stationären Objektes sich nicht von einer klassischen Aufnahme unterscheiden lässt, da die Struktur des Beleuchtungsmusters verschwindet und nur die Gesamtintensität zurückbleibt. Mit der Strukturierung verschwindet ebenfalls sämtliche kodierte Hochauflösung:

$$D(\vec{r}) = \sum_{\forall m} D_m(\vec{r}) \quad (4.3)$$

$$\stackrel{Gl.3.10}{=} \sum_{\forall m} [(I_m \cdot \varrho) \otimes h](\vec{r}) = \left[\left(\sum_{\forall m} I_m \cdot \varrho \right) \otimes h \right](\vec{r}) \quad (4.4)$$

$$\stackrel{Gl.3.5}{=} \left[\left(\sum_{\forall m} \sum_{\forall n} L_n \cdot e^{i\vec{k}_n \vec{r}} \cdot \varrho \cdot e^{i\phi_{mn}} \right) \otimes h \right](\vec{r}) \quad (4.5)$$

$$\stackrel{Gl.3.19}{=} \left[\left(\sum_{\forall n} L_n \cdot e^{i\vec{k}_n \vec{r}} \cdot \varrho \cdot \underbrace{\sum_{m=1}^{m_{ges}} e^{i \cdot m \cdot n \cdot \frac{2\pi}{m_{ges}}}}_{m_{ges} \cdot \delta(n)} \right) \otimes h \right](\vec{r}) \quad (4.6)$$

$$= [(L_0 \cdot \varrho \cdot m_{ges}) \otimes h](\vec{r}) \quad (4.7)$$

Jede Bewegung allerdings führt zu Artefakten, die eine klassische Aufnahme nie haben könnte. Beispielsweise kann sich ein Fluorophor mit dem Minimum des Beleuchtungsmusters mitbewegen und wird dadurch nie Licht emittieren. Folglich fehlt er im rekonstruierten Pseudo-Weitfeld Bild vollständig. Experimentell ist es oft notwendig die Gesamtintensität der Rohbilder zu normalisieren, um die Effekte von Laserfluktuationen (L_n) und Bleichen (ϱ) zu korrigieren. Andernfalls hängen beide Größen vom Bild m ab und der Übergang von Gl. 4.5 zu Gl. 4.6 ist ungültig.

4.1.2. Schritt B - Zerlegung in zwei unabhängige Bilder

Um die FDM durchführen zu können ist ein zweites Weitfeld-Bild notwendig. Bei der Aufnahme einer Zeitserie wäre die Verwendung der Pseudo-Weitfeld Bilder zeitlich aufeinander folgender Rohdaten denkbar. Hierbei offenbart die FDM aber nicht nur die Bewegung welche während einer SIM-Aufnahme stattfand, sondern auch jene Bewegungen welche bis zur nächsten SIM-Aufnahme abliefen. Ist der zeitliche Abstand zwischen den beiden SIM-Aufnahmen viel größer als deren jeweilige Aufnahmedauer, so ist diese Methode gänzlich ungeeignet. Wird beispielsweise zwischen zwei kompletten

SIM-Aufnahmen das System gestoppt, da andernfalls die Fluorophore bleichen, bevor ein vergleichsweise langsamer biologischer Prozess abgelaufen ist, so offenbart die FDM größtenteils Bewegungen des Objektes zwischen den Aufnahmen, welche aber zu keinerlei Artefakten in einem der beiden SIM-Bilder geführt hat.

Eine weitere Möglichkeit ist der Vergleich der Weitfeld Bilder aus den verschiedenen Gitterrichtungen. Dies ist aus zwei Gründen nicht möglich. Erstens, die Anregungseffizienz mancher orientierter (z.B.: interkalierender) Fluorophore hängt von der Polarisation des Anregungslichtes ab [66], welche sich allerdings mit den Gitterrichtungen mitdrehen muss (s. Abschnitt 3.2.5). Zweitens ist dies experimentell sehr schwierig, da die Beleuchtungsstrahlen verschiedener Richtungen auch durch verschiedene Teile der Probe propagieren müssen. Dies führt zu verschiedenen Verlusten durch Absorption und Streuung, sodass sich die Beleuchtung beider Richtungen unterscheiden. Kriterium A der FDM ist daher verletzt [RF5].

Zudem liegt es nahe, die Weitfeld Bilder zweier benachbarter z-Schichten miteinander zu vergleichen. Auch diese Möglichkeit entfällt, da die Bilder beider Schichten zwar die gleiche Probe mit gleicher Beleuchtung zeigen, diese aber mit verschiedenen PSFs (defokus-Term) abgebildet sind. Dies widerspricht Kriterium B der FDM.

Die Generierung des zweiten Bildes ist für 2D- und 3D-SIM verschieden. Sie muss zudem idealerweise für jeden Fokus, sowie für jede Gitterrichtung individuell erfolgen. Ein Artefakt entsteht bereits, wenn sich die Probe nur während der Beleuchtung mit einer Gitterrichtung bewegt.

3D-SIM Die Lösung liegt in der axialen Abtastung der Rohdaten. Da die axiale Auflösungssteigerung des Faktors 2 bereits während der Aufnahme existent ist, müssen die Rohdaten auch doppelt so fein axial abgetastet werden (Abschnitt 3.2.3). Das Weitfeldbild enthält jedoch keine Hochauflösung und ist damit axial überabgetastet und damit redundant. Würde man jeden zweiten Stützpunkt auslassen, so würde man keine Informationen verlieren, da diese neuen Stützpunkte immer noch dem Nyquist-Limit genügen. Daher ist es möglich zwei voneinander unabhängige Pseudo-Weitfeld Bilder zu generieren, indem die Rohbilder von *geraden* (engl.: *even*) und *ungeraden* (engl.: *odd*) Fokuspositionen voneinander getrennt und als individuelle Bildstapel $D_{\text{even}}(\vec{r})$ und $D_{\text{odd}}(\vec{r})$ für die FDM genutzt werden (Abb. 4.1). Kriterium B der FDM ist noch nicht erfüllt, da beide Bildstapel die gleiche Probe mit verschiedenen Foki abbilden. Durch den Verschiebungssatz im Fourierraum (s. Gl. A.6) ist es jedoch möglich den Bildstapel zu refokussieren. Das Shannon-Theorem ist durch äquidistantes scannen in z-erfüllt, sodass die Refokussierung zwischen den Stützstellen exakt ist. Die für die

Verschiebung notwendig Phasenrampe, mit der im Fourierraum multipliziert wird, wird im Folgenden mit K bezeichnet. Dabei werden beide Bildstapel um das halbe axiale SIM-sampling nach oben bzw. unten verschoben und treffen sich damit in der Mitte. Diese Zwischenschichten (engl.: interlayer (IL)) haben somit den gleichen Fokus der Probe und erfüllen Kriterium B der FDM:

$$\tilde{K}_{up/down} = e^{\pm \frac{i\pi k_z}{2 \cdot k_{sampling}}} \quad (4.8)$$

$$D_{even}^{(IL)}(\vec{r}) = [D_{even} \otimes K_{up}] (\vec{r}) \quad (4.9)$$

$$D_{odd}^{(IL)}(\vec{r}) = [D_{odd} \otimes K_{down}] (\vec{r}) \quad (4.10)$$

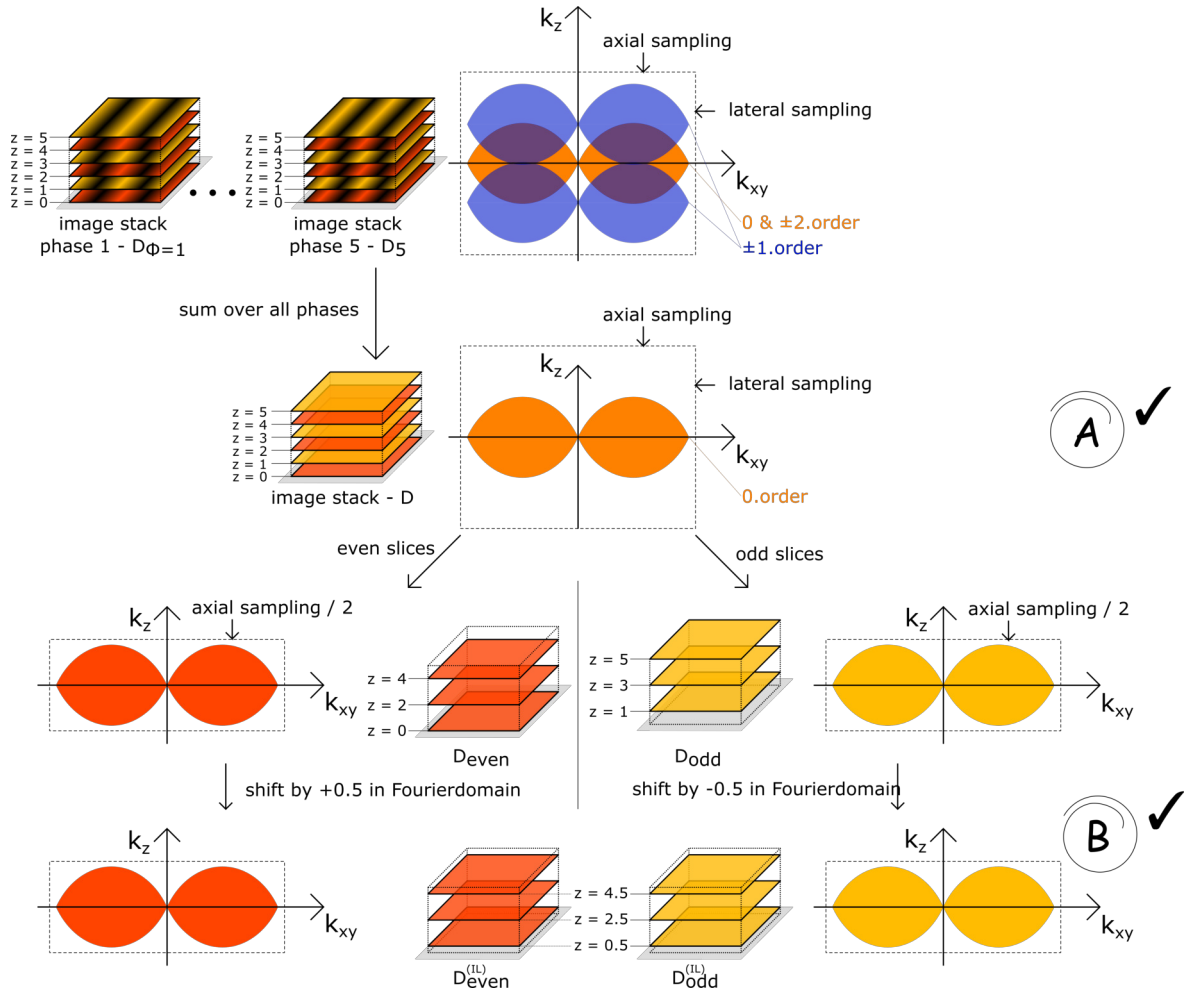


Abbildung 4.1: Die Summe aller Rohbilder einer Richtung generiert ein Pseudo-Weitfeld Bild. Dieses ist axial überabgetastet. Die Zerlegung des z-Stacks in die geraden und ungeraden Fokuspositionen, generiert daher zwei unabhängige und richtig abgetastete Weitfeld Bilder. Deren verschiedene Fokusposition wird durch den Verschiebungssatz im Fourierraum angepasst. Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

2D-SIM Zweistrahl-SIM besitzt keine erhöhte axiale Abtastung im Vergleich zum Weitfeldbild (s. Abschnitt 3.2.3). Ein Vorgehen wie im vorherigen Abschnitt 4.1.2 ist daher nicht möglich. Um das Photonenbudget effektiv zu nutzen und keine zusätzliche Weitfeld Aufnahme machen zu müssen, empfiehlt es sich 4, statt der für die Rekonstruktion nötigen 3, Phasen pro Richtung aufzunehmen. Damit ist das Gleichungssystem für die Rekonstruktion überbestimmt. Dies ermöglicht es, die ersten drei Bilder für eine erste Rekonstruktion zu verwenden (gelb), während die letzten drei Bilder eine zweite ermöglichen (rot). Um zwei vollständig unabhängige Lösungen voneinander zu bekommen, müssen die Phasenschritte äquidistant sein. Dann gilt:

$$-\phi_{schritt} \stackrel{Gl.3.20}{=} \frac{2\pi}{4} = \frac{\pi}{2} \quad (4.11)$$

$${}_{even}\mathbf{M} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ -i & 1 & i \\ -1 & 1 & -1 \end{pmatrix} \leftarrow \mathbf{M} = \begin{bmatrix} \boxed{1} & \boxed{1} & \boxed{1} \\ \boxed{-i} & \boxed{1} & \boxed{i} \\ \boxed{-1} & \boxed{1} & \boxed{-1} \\ \boxed{i} & \boxed{1} & \boxed{-i} \end{bmatrix} \Rightarrow {}_{odd}\mathbf{M} = \begin{pmatrix} -i & 1 & i \\ -1 & 1 & -1 \\ i & 1 & -i \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

Die Inversen Mixing Matrizen ${}_{even/odd}\mathbf{M}^{-1}$ ergeben sich zu:

$${}_{even}\mathbf{M}^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{1-i}{4} & \frac{i}{2} & -\frac{1+i}{4} \\ \frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} \\ \frac{1+i}{4} & -\frac{i}{2} & \frac{-1+i}{4} \end{pmatrix} \quad {}_{odd}\mathbf{M}^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{1+i}{4} & -\frac{1}{2} & \frac{1-i}{4} \\ \frac{1}{2} & 0 & \frac{1}{2} \\ \frac{1-i}{4} & -\frac{1}{2} & \frac{1+i}{4} \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

Für die Rekonstruktion der Weitfeld Ordnung ergibt sich nach Gl. 3.15:

$$D_{even}(\vec{r}) = {}_{even}\Omega_{n'=0}(\vec{r}) = \sum_{\forall m} {}_{even}M_{n'=0\ m}^{-1} \cdot D_m(\vec{r}) = \frac{D_2 + D_4}{2} \quad (4.14)$$

$$D_{odd}(\vec{r}) = {}_{odd}\Omega_{n'=0}(\vec{r}) = \sum_{\forall m} {}_{odd}M_{n'=0\ m}^{-1} \cdot D_m(\vec{r}) = \frac{D_1 + D_3}{2} \quad (4.15)$$

Die beiden Pseudo-Weitfeld Bilder, werden wiederum nur aus den ungeraden bzw. geraden Rohbilder generiert und sind vollständig unabhängig voneinander. Weicht der experimentelle Phasenschritt vom idealen Wert $\frac{\pi}{2}$ ab, so hängen D_{odd} bzw. D_{even} auch von D_2 bzw. D_3 ab und sind nicht vollständig unabhängig. Jedoch ist der Phasenschritt experimentell sehr gut einstellbar, sodass beide Bilder in sehr guter Näherung als unabhängig betrachten und auch im Folgenden behandelt werden können. Experimentell sollte die Mixing Matrix \mathbf{M} jedoch durch die Parameterschätzung optimiert werden.

Die Aufnahme Prozedur kann an dieser Stelle noch verbessert werden. Je größer der zeitliche Abstand zwischen beiden Pseudo-Weitfeld Bilder, desto kleinere Geschwindig-

keiten können detektiert werden. Daher wird die Aufnahmereihenfolge zu D_1, D_3, D_2, D_4 verändert. Nun erzeugen die ersten beiden und die letzten beiden aufgenommenen Bilder je ein Weitfeld Bild und der zeitliche Abstand zwischen D_{odd} und D_{even} ist doppelt so groß wie vorher. Da die Bilder bereits die gleiche Fokusschicht zeigen ist keine axiale Verschiebung notwendig, sodass für 2D-SIM $D_{odd/even}$ auch gleich $D_{odd/even}^{(IL)}$ ist.

Zur Diskussion steht natürlich die Sinnhaftigkeit des für die SIM-Rekonstruktion unnötigen vierten Bildes. Die für die Invertierung nötige Moore-Penrose-Pseudoinverse erhöht die Rechendauer der Rekonstruktion nur unwesentlich [65]. Die Auflösung eines SIM-Systems bestimmt sich nicht nur durch die maximal übertragbare Frequenz in der finalen SIM-OTF, sondern insbesondere auch durch das SNR der Ordnungen. Hierfür gilt:

$$\text{SNR}[\tilde{\Omega}_n(\vec{k})] = \frac{\tilde{\Omega}_n(\vec{k})}{\sigma[\tilde{\Omega}_n(\vec{k})]} \quad (4.16)$$

$$\tilde{\Omega}_n(\vec{k}) = \sum_{\forall m} \mathbf{M}_{nm}^{-1} \cdot \tilde{D}_m(\vec{k}) \stackrel{Gl.3.16}{=} m_{ges} \cdot L_n \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (4.17)$$

$$\sim N_{ges} \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (4.18)$$

$$\sigma^2[\tilde{\Omega}_n(\vec{k})] = \sigma^2 \left[\sum_{\forall m} \mathbf{M}_{nm}^{-1} \cdot \tilde{D}_m(\vec{k}) \right] = \sum_{\forall m} \sigma^2 [\mathbf{M}_{nm}^{-1} \cdot \tilde{D}_m(\vec{k})] \quad (4.19)$$

$$\stackrel{Gl.2.37}{=} \sum_{\forall m} [\mathbf{M}_{nm}^{-1}]^2 \cdot \sigma^2[\tilde{D}_m(\vec{k})] \quad (4.20)$$

$$\stackrel{Gl.3.23}{\sim} \sum_{\forall m} \sigma^2 \left[\int_{\infty} D_m(\vec{r}) \cdot e^{i\vec{k}\vec{r}} d\vec{r} \right] = \sum_{\forall m} \int_{\infty} \sigma^2[D_m(\vec{r})] d\vec{r} \quad (4.21)$$

Das Ausleserauschen modernen Kameras kann in guter Näherung vernachlässigt werden. Die in den Ergebnissen dargestellten Bilder wurden mit einer Orca Flash 4.0 (Hamamatsu, Japan) aufgenommen. Das Ausleserauschen beträgt laut Hersteller 1.6 Elektronen [67]. Die Varianz eines Pixels ist folglich durch die dortige Anzahl an Photonen gegeben. Die Varianz entspricht daher der Gesamtzahl an Photonen in allen Bildern N_{ges} :

$$\sigma^2[\tilde{\Omega}_n(\vec{k})] \sim \sum_{\forall m} \int_{\infty} D_m(\vec{r}) d\vec{r} = N_{ges} \quad (4.22)$$

Das SNR einer SIM-Ordnung ist daher gegeben durch:

$$\text{SNR}[\tilde{\Omega}_n(\vec{k})] \sim \frac{N_{ges} \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k})}{\sqrt{N_{ges}}} = \sqrt{N_{ges}} \cdot \tilde{\varrho}(\vec{k} - \vec{k}_n) \cdot \tilde{h}_n(\vec{k}) \quad (4.23)$$

Das SNR einer SIM-Ordnung hängt demnach nicht von der Anzahl der Rohbilder ab, sondern von der Anzahl an Photonen. Daher braucht SIM mit 4-Phasen nicht mehr Photonen als mit 3-Phasen, um die gleiche Auflösung zu erzielen. Das verfügbare Photonenbudget wird durch die für die Bewegungsdetektion notwendige vierte Phase nicht verschwendet. Um die Anzahl an Photonen konstant zu halten ist die Belichtungszeit pro Rohbild um $1 - \frac{3}{4} = 25\%$ zu kürzen. Da die Gesamtbelichtungszeit konstant gehalten wird, erhöht sich die Gesamtaufnahmedauer nur um die Dauer eines Auslesezyklus und somit nur um wenige Millisekunden. Die hier beschriebene Form der Generierung des zweiten Pseudo-Weitfeld Bildes in 2D-SIM ist damit minimalinvasiv.

Um 2D-SIM mit 4-Phasen zu rekonstruieren ist die Moore-Penrose-Pseudoinverse \mathbf{M} notwendig (s. Gl. 4.12 und Abschnitt 3.2.5):

$$\mathbf{M}^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{1}{4} & \frac{i}{4} & -\frac{1}{4} & -\frac{i}{4} \\ \frac{1}{4} & \frac{1}{4} & \frac{1}{4} & \frac{1}{4} \\ \frac{1}{4} & -\frac{i}{4} & \frac{1}{4} & \frac{i}{4} \end{pmatrix} \quad (4.24)$$

4.2. Schritt C - Unterscheidung von Bewegung und Rauschen

Die Differenz der beiden Pseudo-Weitfeld Bilder $D_{even/odd}^{(IL)}(\vec{r})$ in der FDM geniert das Differenzbild $\Delta(\vec{r})$. Das Vorhandensein von signifikantem Rauschen sorgt dafür, dass die Differenz zwar Bewegung enthüllt, das Signal aber von Rauschen überlagert wird:

$$\Delta(\vec{r}) = D_{even}^{(IL)}(\vec{r}) - D_{odd}^{(IL)}(\vec{r}) \approx [S^{(IL)}(t_0) - S^{(IL)}(t_0 + \Delta t) \otimes h](\vec{r}) \quad (4.25)$$

$$\hat{=} \text{Bewegung} + \text{Skellam- und Ausleserauschen} \quad (\text{s. Abschnitt 2.5.1}) \quad (4.26)$$

$$\approx \text{Bewegung} + \text{Gaußrauschen} \quad (\text{s. Abschnitt 2.5.3}) \quad (4.27)$$

Um die unbekannte Bewegung vom Rauschen trennen zu können, muss dieses bestmöglich geschätzt werden. Dies erfolgt durch eine Fehlerfortpflanzung der Bildverarbeitung von den Rohbildern bis zum Differenzbild. Der Fehler eines Bildes wird Varianzkarte genannt.

4.2.1. Varianzkarte

Die Fehlerfortpflanzung kann einfach dargestellt werden, indem das Poissonrauschen durch eine Gaußverteilung approximiert wird. Das Summieren von 2 (2D-SIM) bzw. 5 (3D-SIM) Rohbilder erhöht die Anzahl an Photonen zusätzlich, sodass die Näherung noch besser ist.

Varianz eines Rohbildes Die Varianz eines Poisson-verrauschten Pixels $\sigma_{Pois}^2[D_m(\vec{r})]$ ist identisch zu seinem Erwartungswert $\mu[D_m(\vec{r})]$. Dieser wiederum wird bestmöglich durch die Anzahl gemessener Photonen +1 geschätzt (s. Abschnitt 2.5.1). Der Wert eines Pixels entspricht lediglich der Anzahl der Photoelektronen und nicht der Photonen selbst. Beide Größen sind durch die Verstärkung der Kamera g (engl.: *gain*) verknüpft und müssen umgerechnet werden. Die Verstärkung einer Kamera muss durch deren Kalibrierung experimentell bestimmt werden.

$$\sigma_{Pois}^2[g \cdot D_m(\vec{r})] = g^2 \cdot \sigma_{Pois}^2[D_m(\vec{r})] \quad (4.28)$$

$$\sigma_{Pois}^2[g \cdot D_m(\vec{r})] = \mu[g \cdot D_m(\vec{r})] \approx g \cdot D_\phi(\vec{r}) + 1 \quad (4.29)$$

$$\sigma_{Pois}^2[D_m(\vec{r})] = \frac{D_m(\vec{r})}{g} + \frac{1}{g^2} \quad (4.30)$$

Zum Poissonrauschen kommt noch das geschätzte Rauschen der Photoelektronen und das Ausleserauschen der Kamera hinzu σ_{dark}^2 . Dies kann durch die Aufnahme von Dunkelbildern bestimmt werden. Für die Varianz im Pixel eines Rohbildes gilt daher:

$$\sigma^2[D_m(\vec{r})] = \sigma_{Pois}^2[D_m(\vec{r})] + \sigma_{dark}^2 \quad (4.31)$$

Das Summieren von Rohbildern, geht mit dem Summieren der Varianzen einher. Daher gilt für 2D-SIM:

$$Gl. 4.15 : D_{odd}(\vec{r}) = \frac{D_1 + D_3}{2} \implies \sigma^2[D_{odd}(\vec{r})] = \frac{\sigma^2[D_1] + \sigma^2[D_3]}{2} \quad (4.32)$$

$$D_{even}(\vec{r}) = \frac{D_2 + D_4}{2} \implies \sigma^2[D_{even}(\vec{r})] = \frac{\sigma^2[D_2] + \sigma^2[D_4]}{2} \quad (4.33)$$

Für 3D-SIM gilt ($m_{ges} = 5$):

$$Gl. 4.3 : D(\vec{r}) = \frac{1}{m_{ges}} \sum_{\forall m} D_m(\vec{r}) \implies \sigma^2[D(\vec{r})] = \frac{1}{m_{ges}} \sum_{\forall m} \sigma^2[D_m(\vec{r})] \quad (4.34)$$

Das notwendige Zerlegen der verschiedenen Foki in gerade und ungerade Schichten, zerlegt analog auch die Varianz in $\sigma^2[D_{even}(\vec{r})]$ und $\sigma^2[D_{odd}(\vec{r})]$. Die anschließende Verschiebung des Fokus in 3D-SIM erfolgt durch eine Faltung des Bildstapels mit dem Kernel $K_{up/down}(z)$. Die Varianz des Bildstapels muss hierbei mit K^2 gefaltet werden (s. Gl. 2.42). Die Faltung führt zu einer Korrelation des Rauschens entlang z . Dies

muss allerdings nicht weiter berücksichtigt werden, da keine weitere Bildverarbeitung zwischen Pixeln verschiedener Fokusschichten erfolgt.

$$\xrightarrow{Gl. 4.9} \sigma^2[D_{even}^{(IL)}(\vec{r})] = [\sigma^2[D_{even}] \otimes K_{up}^2](\vec{r}) \quad (4.35)$$

$$\sigma^2[D_{odd}^{(IL)}(\vec{r})] = [\sigma^2[D_{odd}] \otimes K_{down}^2](\vec{r}) \quad (4.36)$$

Die anschließende Bildverarbeitung ist für 2D- und 3D-SIM identisch. Obwohl $\Delta(\vec{r})$ aus einer Differenz gebildet wird, addieren sich die Varianzen dennoch:

$$\sigma^2[\Delta(\vec{r})] = \sigma^2[D_{even}^{(IL)}(\vec{r})] + \sigma^2[D_{odd}^{(IL)}(\vec{r})] \quad (4.37)$$

4.2.2. Der z-score

Die Entscheidung ob das Signal $\Delta(\vec{r})$ ausschließlich Rauschen zeigt, oder ob zusätzlich eine Bewegung vorliegt, erfolgt für jeden Pixel individuell durch den z-score (s. Abschnitt 2.5.4). Dabei wird die Hypothese getroffen, dass keine Bewegung stattfand. Wird die Hypothese durch den z-score widerlegt, so ist eine Bewegung detektiert. Der Ablauf ist in Abb. 4.2 zusammengefasst. Die beiden Werte $D_{even}^{(IL)}(\vec{r})$ und $D_{odd}^{(IL)}(\vec{r})$ entstehen aus zwei unabhängigen gaußverteilten Messungen. Gibt es keine Bewegung, so messen $D_{even/odd}^{(IL)}$ das gleiche Objekt, sodass insbesondere der Erwartungswert beider Messungen identisch ist. Folglich ist der Erwartungswert des Differenzbildes:

$$\mu[\Delta(\vec{r})] = 0 \quad (4.38)$$

Der z-score der Wahrscheinlichkeitsverteilung des Differenzbildes wird gebildet, indem $\Delta(\vec{r})$ mit seiner eigenen Standardabweichung $\sigma[\Delta(\vec{r})]$ normiert wird. Das Vorzeichen der Differenz ist unwichtig, da es irrelevant ist, ob ein Objekt den Ort erreicht oder verlässt. Daher wird zudem der Betrag gebildet:

$$z(\vec{r}) = \frac{|\Delta(\vec{r}) - \mu[\Delta(\vec{r})]|}{\sigma[\Delta(\vec{r})]} = \frac{|\Delta(\vec{r})|}{\sigma[\Delta(\vec{r})]} \quad (4.39)$$

Je höher der z-score desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass er durch Rauschen allein zu erklären ist. Durch die Gaußsche Fehlerfunktion erf (Gl. 2.49) kann abgeschätzt werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit $P_G(\vec{r})$ ist, dass der gemessene z-score

- oder gar ein noch höherer - allein durch gaußsches Rauschen der hypothetischen Verteilung $\mathcal{N}(\mu = 0, \sigma[\Delta(\vec{r})])$ entsteht:

$$P_G = P(z \geq z(\vec{r}) | \mathcal{N}(\mu = 0, \sigma[\Delta(\vec{r})])) \quad (4.40)$$

$$= 1 - P(z < z(\vec{r}) | \mathcal{N}(\mu = 0, \sigma[\Delta(\vec{r})])) = 1 - \operatorname{erf}\left(\frac{z(\vec{r})}{\sqrt{2}}\right) \quad (4.41)$$

Ein z-score von mindestens 6.5 führt zu einer Wahrscheinlichkeit (P_G) von $8 \cdot 10^{-11}$ oder anders formuliert „nur ein Event aus 12.5 Milliarden Versuchen“ (siehe Tabelle 2). An dieser Stelle muss die Ausgangshypothese als falsch angesehen werden, und die beiden Messungen $D_{\text{even/odd}}^{(IL)}(\vec{r})$ beruhen nicht auf demselben Objekt, sodass sich dieses bewegt haben muss. Die Grenze von 6.5 ist hierbei empirisch gewählt. Es stützt darauf, dass ein SIM-Bild aus etwa 20 Millionen Pixeln besteht ($[x, y, z] = [1000, 1000, 20]$). Hinzu kommen die 3 Richtungen in der Aufnahme sowie mehrere Farben oder die

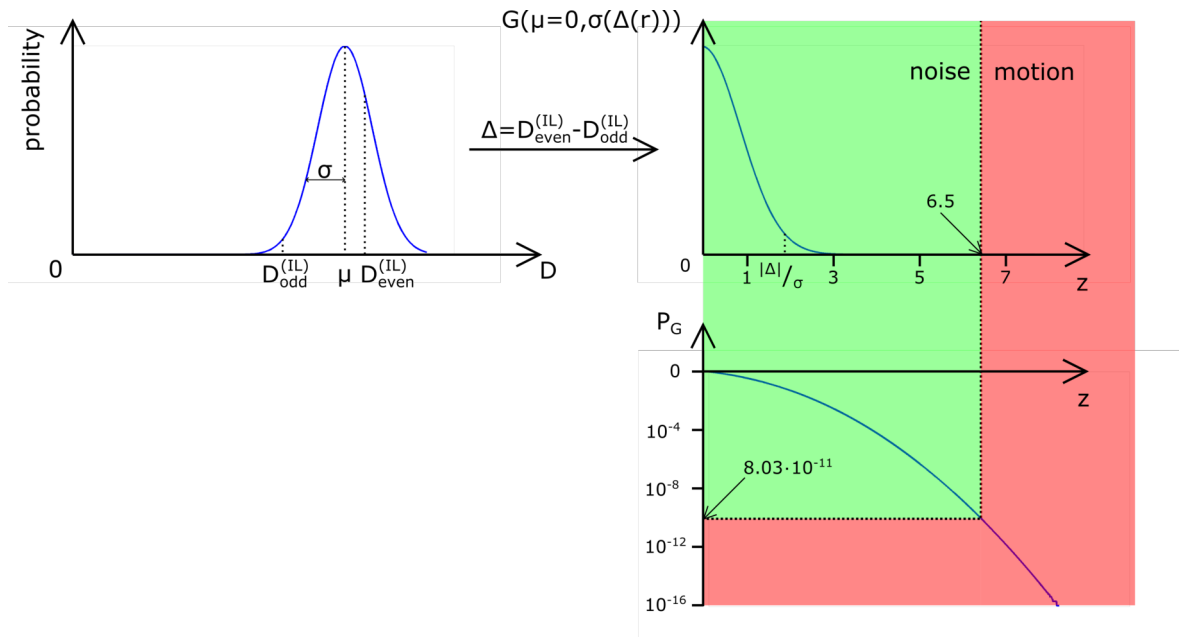


Abbildung 4.2: Test der Hypothese, dass zwei unabhängige gaußverteilte Messwerte $D_{\text{even}}^{(IL)}(\vec{r})$ und $D_{\text{odd}}^{(IL)}(\vec{r})$ derselben Messung (Objekt) entspringen (oben links). Dies wird durch den z-score erreicht, der die Abweichung Δ beider Messwerte auf die abgeschätzte Standardabweichung $\sigma[\Delta(\vec{r})]$ skaliert (oben rechts). Die Gaußsche Fehlerfunktion zeigt wie wahrscheinlich das Auftreten der beiden Messwerte ist (unten rechts). Der Schwellwert zwischen stationärer (richtige Hypothese / grün) und bewegter Probe (falsche Hypothese / rot) ist bei einem z-score von 6.5. Dieser hat eine Wahrscheinlichkeit von 1 : 12.5 Milliarden bzw. $= 8 \cdot 10^{-11}$. Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

Aufnahme einer Zeitserie. Der Unterschied von 3 Größenordnungen soll verhindert, dass vernachlässigbare Bewegungen, geringfügige Aberrationen oder nicht ideal korrigierte Laserfluktuationen sofort zu einer Bewegungsdetektion führen.

4.2.3. Erhöhung des SNR im z-score

Das SNR des z-scores kann erhöht werden, indem die Korrelation benachbarter Pixel berücksichtigt wird. Das gaußsche Rauschen in $D_{\text{even/odd}}^{(IL)}(\vec{r})$ ist unkorreliert in x und y . Dies führt insbesondere dazu, dass das Vorzeichen des Rauschens fluktuiert. Das Signal hingegen ist korreliert, da die Objektinformation durch die PSF über das Bild verteilt wird. Eine Bewegung führt folglich dazu, dass ein Objekt in einem Bereich der PSF fehlt und das Differenzbild an diesem Bereich entweder vollständig positiv oder negativ ist. Wird das Differenzbild mit der PSF h , sowie seine Varianz entsprechend mit h^2 , gefaltet, so erhöht sich das Signal einer Bewegung konstruktiv, während das Rauschen aufgrund des fluktuierenden Vorzeichens reduziert wird. In Abb. 4.3 ist die Erhöhung des SNR in simulierten Daten deutlich zu erkennen.

$$z_h(\vec{r}) = \frac{[\Delta \otimes h](\vec{r})}{[\sigma^2 \otimes h^2](\vec{r})} \quad (4.42)$$

Der Hypothesentest wird auf jede der drei Gitterrichtungen individuell angewandt, die durch eine Maximums Projektion über alle Richtungen vereint werden. Es reicht demnach aus, wenn die Bewegung in einer Richtung detektiert wird. In den anderen beiden Richtungen ist eventuell gar keine Bewegung vorhanden, da das Objekt bereits weg ist. Für die Entstehung eines Artefaktes reicht die Bewegung in einer Gitterrichtung aber aus.

MaxPhoton = 1000; #Photons BG = 10; Movement[nm] = 8; NA = 1.4; λ [nm] = 532

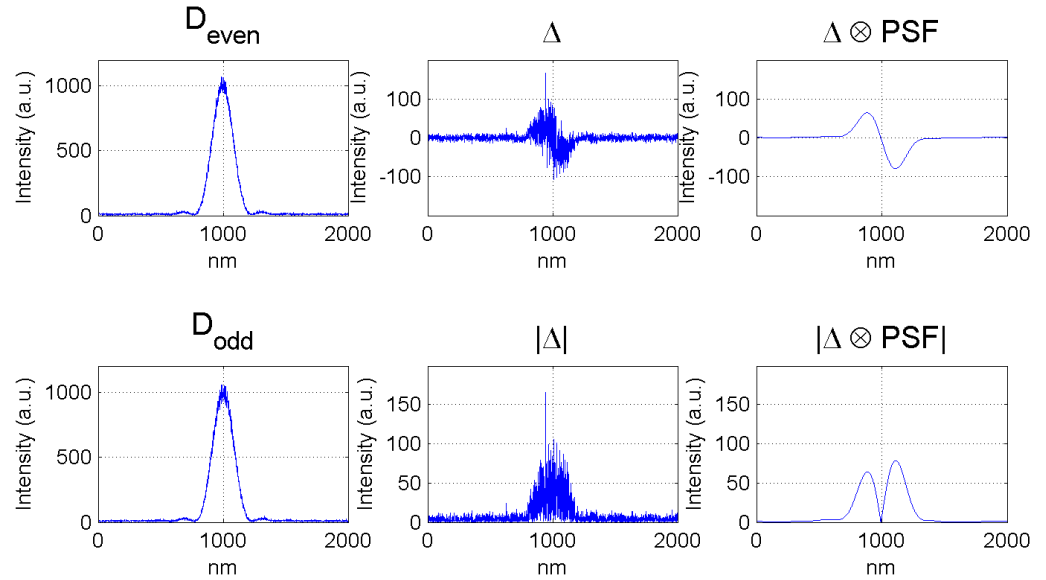


Abbildung 4.3: Die Signale von $D_{\text{even}}(\vec{r})$ und $D_{\text{odd}}(\vec{r})$ sind um 8 nm verschoben und haben ein SNR von 20 (linke Spalte). Das Rauschen überträgt sich auf das Differenzbild $\Delta(\vec{r})$, sowie dessen Betrag $|\Delta(\vec{r})|$. Dadurch hat das Bewegungssignal ein sehr schlechtes SNR. Dies kann durch eine Faltung mit der 2D-PSF in jeder Fokusschicht individuell erheblich verbessert werden (rechte Spalte).

5. Detektion von Bewegungen an lebenden Zellen

Da sich die Bewegungsdetektion von 2D- und 3D-SIM nur in der Generierung der beiden Pseudo-Weitfeld Bilder unterscheiden, wird diese für beide Techniken hier nachgewiesen. Die vollständige Bewegungsdetektion wird anschließend ausschließlich für 3D-SIM, welche deutlich anspruchsvoller als 2D-SIM ist, ausführlich demonstriert und diskutiert.

5.1. Zweistrahl-SIM

5.1.1. BPAE-Zelle

SIM-Rohbilder Die Abbildung von BPAE-Zellen (bovine pulmonale arterielle Endothelzellen) mit 2D-SIM in 4 Phasen zeigt, dass Bewegung und Moiré-Effekt nicht zwingend in den Rohdaten zu unterscheiden sind^[17]. Die Zellen sind hierbei fixierte FluoCellsTM Prepared Slide #1 (BPAE cells with MitoTrackerTM Red CMXRos, Alexa FluorTM 488 Phalloidin, and DAPI; ThermoFisher, Massachusetts, USA). Abbildung 5.1 zeigt ein Rohbild. Anhand der roten und des blauen Vierecks sollen zwei Effekte bei der Aufnahme von SIM demonstriert werden.

Im roten Viereck wird besonders deutlich, dass es unmöglich ist, den Moiré-Effekt von einer Bewegung zu trennen. Abbildung 5.2 zeigt die 4 Rohbilder die in einer SIM-Richtung aufgenommen wurden sind. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass die 4 Bilder verschieden sind. Insbesondere der lange isolierte Actin-Strang in der Mitte ist im ersten Bild (ganz links) durchgehend, während er schon im nächsten Bild (rechts daneben) eine Lücke aufweist. Dies kann eine Bewegung sein - muss es aber nicht.

Dies wird deutlich beim Vergleich mit dem Beleuchtungsmuster, welches im blauen Viereck am besten untersucht werden kann. Die 4 Rohbilder zeigen in Abb. 5.3 hierbei sehr deutlich die 4 verschiedenen Phasen, wenn man den künstlich eingefügten und fixierten weißen Balken als Referenz verwendet. Es ist insbesondere zu sehen, dass der erste Phasenschritt π beträgt, wodurch das Gitter um eine halbe Gitterperiode verschoben wird. Dadurch zeigt die Referenzlinie in Abb. 5.3 erst auf ein Maximum (ganz links) und im nächsten Rohbild genau auf das Minimum (zweites von links).

¹⁷Die Aufnahme erfolgte durch Christian Karras am fastSIM-system.

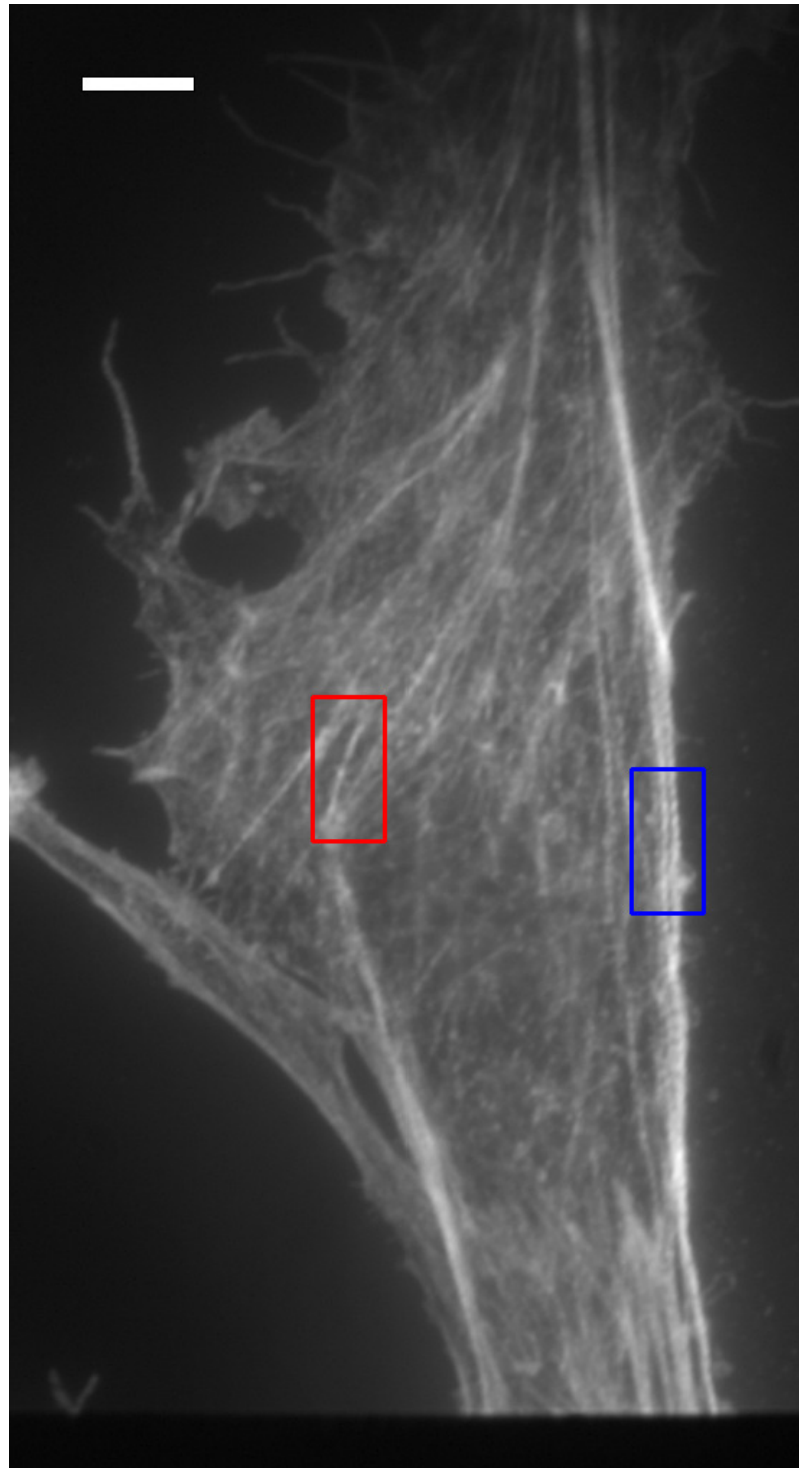


Abbildung 5.1: Rohbild 2D-SIM BPAE-Zelle. Der Inhalt des roten und des blauen Vierecks sind im Folgenden vergrößert und demonstrieren das Problem Bewegung und sich veränderndes Beleuchtungsmuster zu trennen. Die dunkle Kante am unteren Rand des Bildes entsteht durch die Apertur des dichroitischen Strahlteilers. (Balken = 5 μm ; $\gamma = 0,5$)

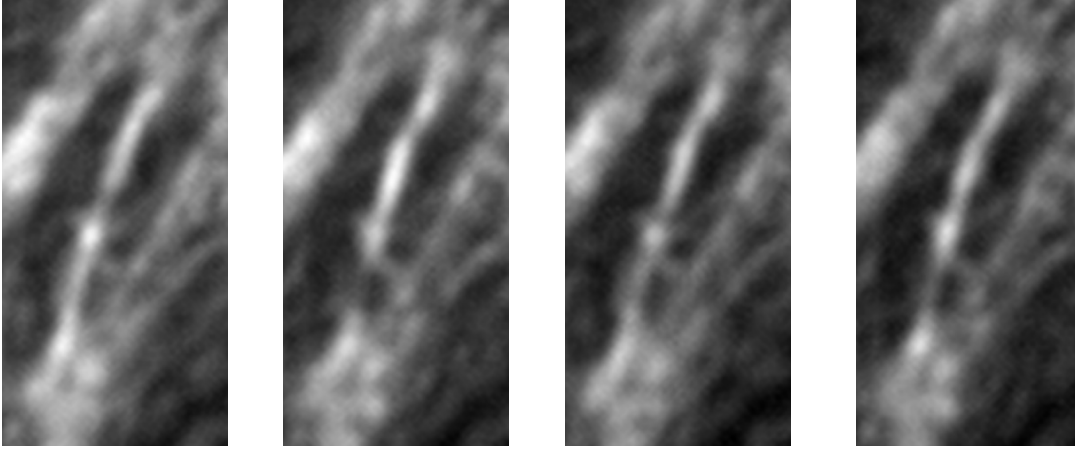


Abbildung 5.2: Die Aufnahme von 4 Rohbildern (mit Phasen: $\phi = \{0; \pi; \frac{\pi}{2}; \frac{3\pi}{2}\}$) einer Beleuchtungsrichtung von einer BPAE-Zelle zeigt, dass sich das Bild stets verändert. Bewegung oder Moiré Effekt sind in den Rohbilder von SIM nicht zu trennen.

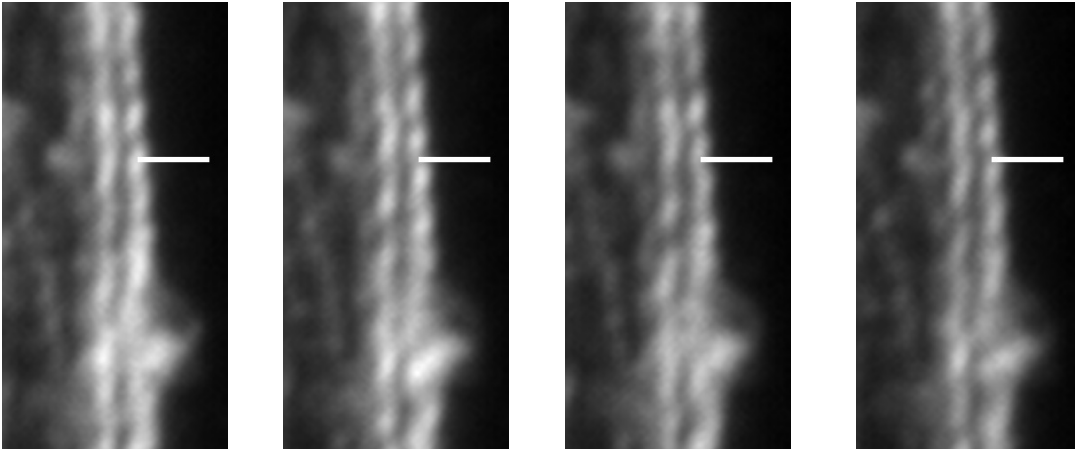


Abbildung 5.3: Das Anregungsgitter in 2D-SIM wechselt nach jedem Rohbild (mit Phasen: $\phi = \{0; \pi; \frac{\pi}{2}; \frac{3\pi}{2}\}$). Die fixierte weiße Referenzlinie macht dies deutlich.

Pseudo Weitfeld Bilder von BPAE-Zelle Durch die Kombination der ersten bzw. letzten beiden Bilder zu den Pseudo Weitfeld Bilder D_{even} und D_{odd} (s. Gl. 4.15) lässt sich Bewegung von Moiré Effekt trennen. Das Pseudo Weitfeld Bild D_{even} ist hierbei in Abb. 5.4 dargestellt. Die beiden Vierecke in rot und blau sind erneut an den gleichen Stellen positioniert.

Der Vergleich der beiden Pseudo Weitfeld Bilder im roten Viereck ist in Abb. 5.5 dargestellt. Es ist sehr deutlich zu erkennen, dass beide Bilder identisch sind. Insbesondere die lange isolierte Struktur in der Mitte, ist nun in beiden Bildern durchgängig. Die in Abb. 5.2 zu sehende Veränderung des Objektes ist daher auf den Moiré Effekt zurückzuführen.

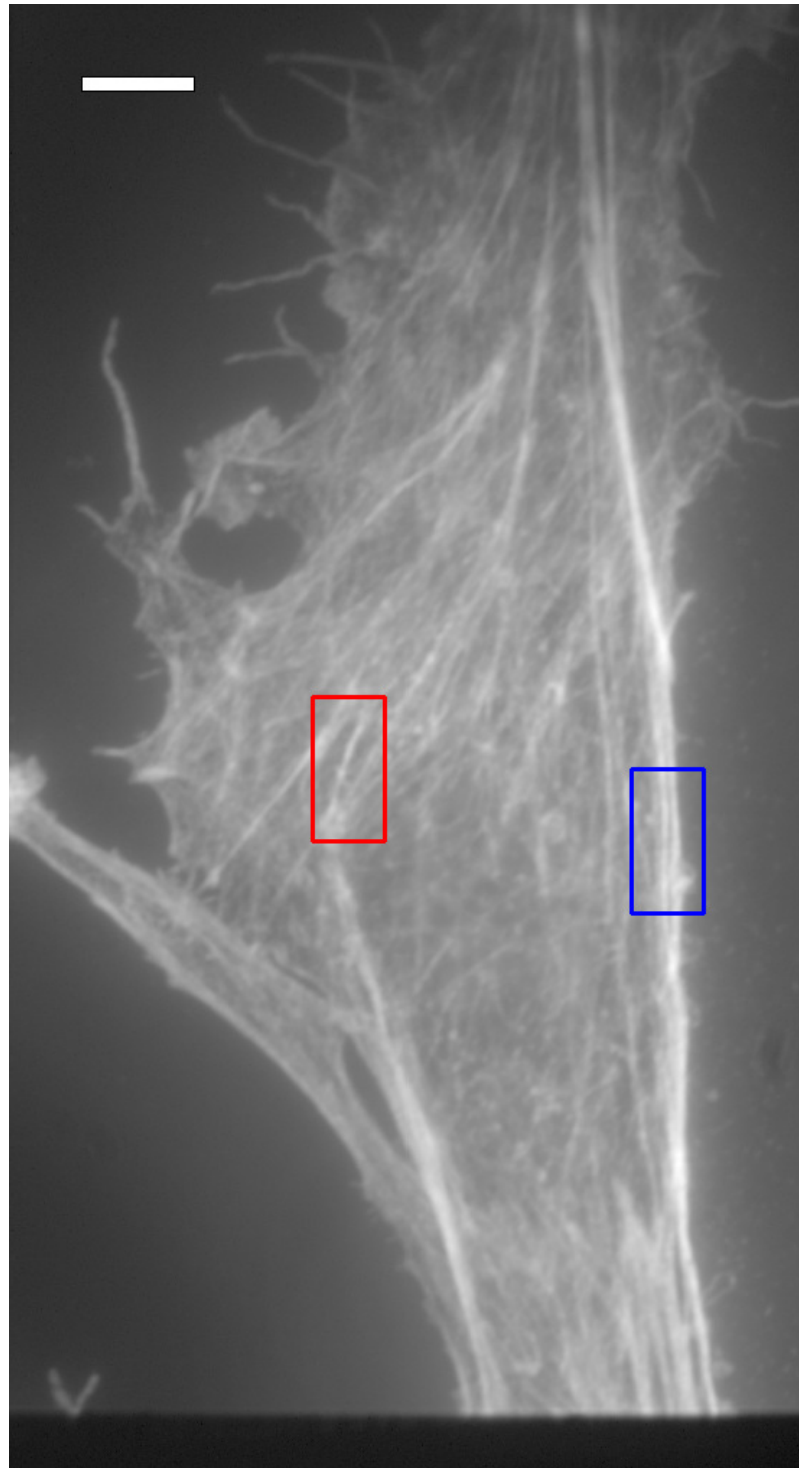


Abbildung 5.4: Durch die Summe der ersten beiden Rohbilder entsteht das Pseudo Weitfeld Bild in 2D-SIM an einer BPAE-Zelle. Es ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass das Beleuchtungsmuster verschwindet (s. blaues Rechteck). (Balken = 5 μm ; $\gamma = 0,5$)

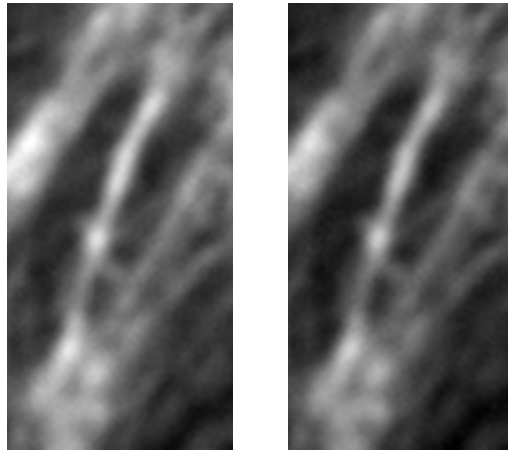


Abbildung 5.5: Der Vergleich zweier Pseudo Weitfeld Bilder in 2D-SIM an einer BPAE-Zelle zeigt, dass die vorher vermutete Bewegung nicht stattfindet. Die vermeintliche Bewegung war lediglich ein Interferenz-/ Moiré-Effekt.

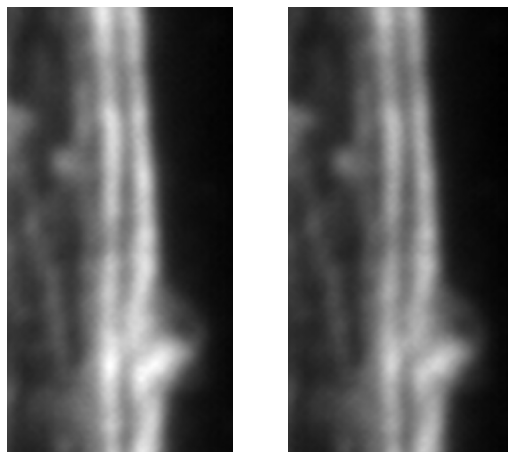


Abbildung 5.6: Die effektive Anregung der Pseudo Weitfeld Bilder ist Homogenen. Dies verdeutlicht die Vergrößerung eines Bereiches mit wenig Details im Pseudo Weitfeld Bild einer 2D-SIM einer BPAE-Zelle

Der Vergleich der beiden Weitfeld Bilder ist nur deswegen sinnvoll, da das effektive Beleuchtungsmuster der Pseudo Weitfeld Bilder identisch - und hier sogar homogen - ist. Dies ist in Abb. 5.6 zu erkennen. Das Beleuchtungsmuster, welches in den Rohbildern in Abb. 5.3 zu erkennen ist, ist verschwunden. Das rechte Bild ist ein wenig dunkler. Dies ist auf das Bleichen der Probe zurückzuführen, welches hier zur Demonstration noch nicht korrigiert wurde.

Vergleich verschiedener Beleuchtungsrichtungen Wie in Abschnitt 4.1.2 erklärt, ist der Vergleich der Pseudo Weitfeld Bilder verschiedener Richtung durch die Frame Difference Method nicht möglich. Dies wird Belegt durch die in Abb. 5.7 gezeigten Pseu-

do Weitfeld Bilder der 3 Richtungen. Die Helligkeitsunterschiede zwischen den Bildern sind nicht homogen und können dadurch auch nicht durch eine einfache Normierung behoben werden.

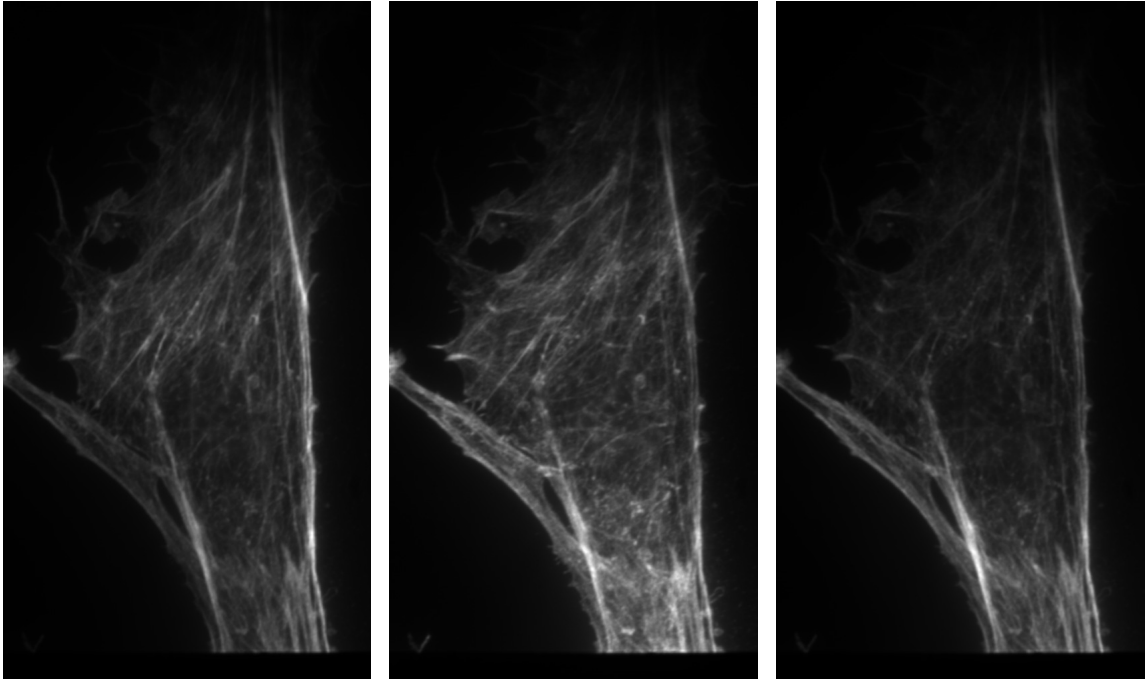


Abbildung 5.7: Vergleich der Pseudo Weitfeld Bilder verschiedener Gitterrichtungen im *fastSIM*.

5.1.2. Beads

Wie gut sich stationäre von beweglichen Teilchen trennen lassen zeigt am besten die Aufnahme folgender künstlicher Probe. Fluoreszenter Textmarker wurde auf einer speziellen Petrischale (Ibibi, Martinsried) aufgetragen und trocknen gelassen. Das anschließende Auftragen von Ethanol löst einige der Fluorophore, sodass diese sich von der Schale lösen und durch das Bild schwimmen^[18].

Abbildung 5.8 zeigt die aus den Rohdaten erzeugten Pseudo Weitfeld Bilder $D_{\text{even/odd}}$. Mit bloßem Auge ist kein Unterschied zu erkennen. Stationäre Objekte werden durch die Differenzbildung eliminiert, während sich bewegende Objekte verbleiben (unten Mitte):

Diese sehr einfache Methode kann schnell berechnet werden. Der hier dargestellte Datensatz (ROI: $42 \times 72 \mu\text{m}^2$) kann innerhalb von 88 ms in das Differenzbild umgerechnet werden. Der Nutzer kann instantan Prüfen, ob Bewegungen in irgendeiner Form

¹⁸Präparation und Aufnahme wurden erneut von Christian Karras durchgeführt.

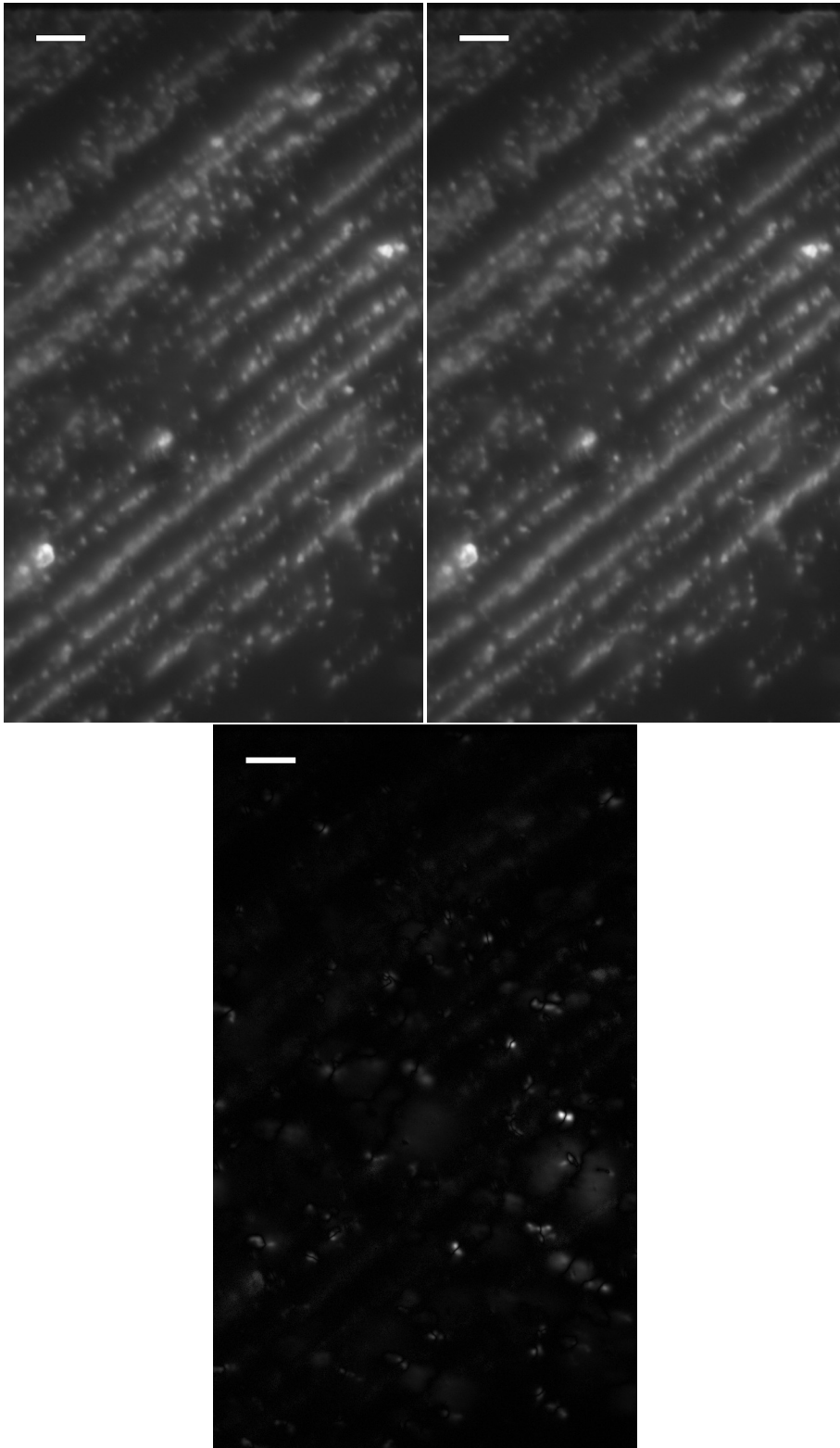


Abbildung 5.8: Oben: Pseudo Weitfeld Bilder von 2D-SIM Daten ($\gamma = 0,4$). Unten: Betrag des Differenzbildes enthüllt Bewegung (Balken = 5 μm)

vorhanden sind. Liegt der Verdacht nahe, könnte man die komplette - und deutlich umfangreichere - Bewegungsdetektion und Klassifizierung vollautomatisch durchführen lassen.

5.2. Dreistrahl-SIM

5.2.1. Probenpräparation und experimentelle Parameter

Die Daten wurden am Elyra S1, einem kommerziellen SIM-System der Firma Zeiss, aufgenommen und ausgewertet. Das Elyra S1 ist ein relativ langsames, aber robustes und viel genutztes System. Ein Nachweis der Bewegungsdetektion an diesem Gerät ist daher von großer Bedeutung. Grundsätzlich ist der hier vorgestellte Algorithmus jedoch in der Lage SIM-Daten vom sämtlichen kommerziellen Geräten, sowie Prototypen zu verarbeiten^[19].

Die Bilder zeigen eine lebende Spaltöffnung (auch Stoma genannt) auf der Oberfläche eines Efeu-Blattes (lat.: *Epipremnum aureum*). Abgebildet wird hierbei das autofluoreszente Chlorophyll ($\lambda_{em} > 655\text{nm}$), welches sich aus einzelnen Thylakoiden zusammensetzt. Das Anfärben der Probe mit Fluorophoren ist daher nicht nötig. Die Zellschichten innerhalb des Blattes - das Mesophyll - besitzt sehr viel Chlorophyll, sodass die Abbildung der Spaltöffnung durch sehr viel Hintergrundlicht gestört wird. Daher wurden die obersten Zellschichten durch ein Skalpell vom Mesophyll getrennt. Durch das Zerschneiden von Zellen gelangen Chloroplasten aus diesen heraus und schwimmen im Einbettungsmedium der Zelle umher. Chloroplasten können sehr verschiedene Formen haben. Ein Vergleich unserer Objekte mit denen von Rumak et al. untersuchten verschiedensten Formen von Chloroplasten zeigt, dass die im Objekt frei beweglichen Objekte tatsächlich Chloroplasten sein müssen [68]. Die schwimmenden Chloroplasten sollen später, als sich bewegende Objekte, detektiert werden. Die Spaltöffnung selbst ist durch die umliegenden Zellen fixiert und wird als stationär aufgenommen. Durch das Zerschneiden der Zellen gelangen auch einzelne fluoreszente Partikel in die Probe. Es ist davon auszugehen, dass diese einzelne Thylakoiden sind.

Für die Abbildung wurde ein Plan-Apochromat Öl-Objektiv (63x/ 1,4; Zeiss) verwendet. Als Kamera diente die Andor iXonEM+ (Andor, Belfast, Nordirland). Kamera Verstärkung und Ausleserauschen wurden experimentell zu (0,11 Elektronen/ADU)^[20]

¹⁹Die Zusammenarbeit mit der Firma Zeiss war hierbei Bestandteil des Förderprojektes „Schnelle Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung zur Lebend-Zell-Diagnostik (FastFibreSIM)“; BMBF (FKZ 13N13140).

²⁰ADU - Analog Digital Unit

und 17,0 Elektronen rms bestimmt^[21]. Das Chlorophyll wurde hierbei bei einer Wellenlänge von $\lambda_{exc} = 642$ nm angeregt. Die Ausgangsleistung^[22] des Lasers beträgt schätzungsweise 1,5 mW. Die Belichtungszeit für ein Rohbild lag bei 400 ms. Eine längere Belichtung führte zu phototoxischen Schäden, die sich in einem Aufblasen bis Zerplatzen der belichteten Zellen zeigten. Die Autofluoreszenz wurde durch einen Longpass ($\lambda_{bp} = 655$ nm) vom Anregungslicht getrennt.

Abbildung 5.9 zeigt das Pseudo-Weitfeld Bild als Summe aller Phasen und Richtungen.

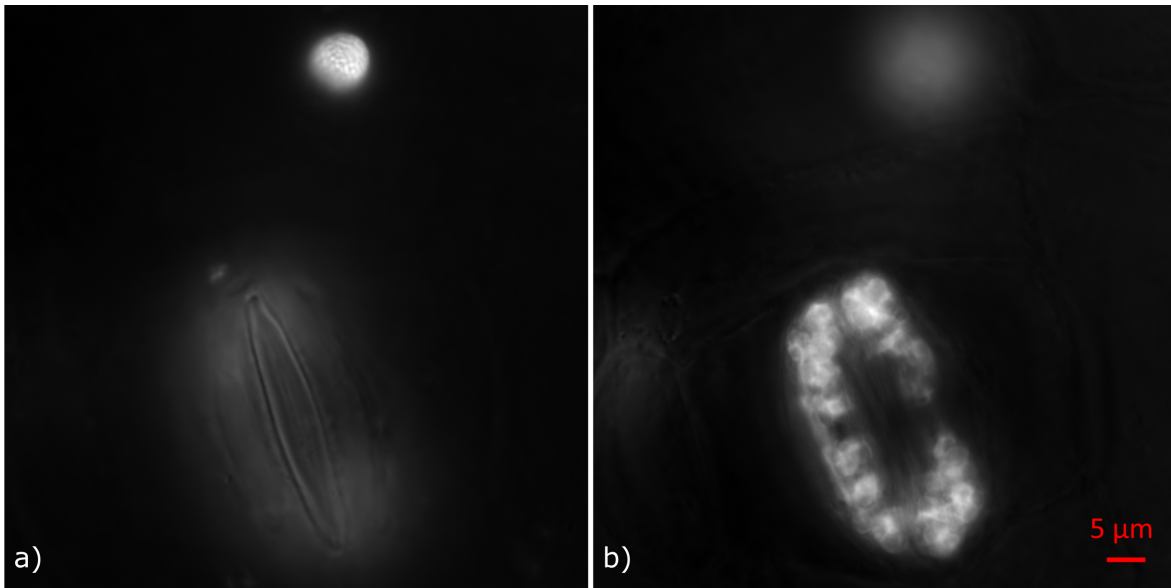


Abbildung 5.9: Pseudo-Weitfeld Bilder aus einem SIM z-stack. Fokussiert auf einen frei beweglichen Chloroplasten (a) und eine durch seine Nachbarzellen fixierte Spaltzelle (Stoma) (b). Zwischen beiden Schichten liegen in etwa $5 \mu\text{m}$. Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

Die Bilder zeigen das freie Chloroplast in etwa $5 \mu\text{m}$ über der Spaltöffnung. Aus phototoxischen Gründen ist es nicht möglich, diesen gesamten z-Bereich abzubilden. Daher wurden 2 getrennte z-Stacks aufgenommen. Erst 24 Schichten mit dem fokussierten Chloroplast und der Spaltöffnung unscharf im Hintergrund (a). Danach 28 Schichten mit der Spaltöffnung im Fokus (b).

Abbildung 5.10 zeigt hierbei den Bildausschnitt mit dem Chloroplast. Die Rekonstruktion der SIM-Daten demonstriert die Hochauflösung. Das SIM-Bild auf der rechten Seite trennt die Thylakoiden sehr deutlich voneinander, während diese im Weitfeld überwiegend als ein Objekt ohne feine Strukturen abgebildet wird.

²¹RMS - mittleres quadratisches Mittel (engl.: Root Mean Square)

²²Wert des AOTF multipliziert mit der Maximalleistung des Lasers

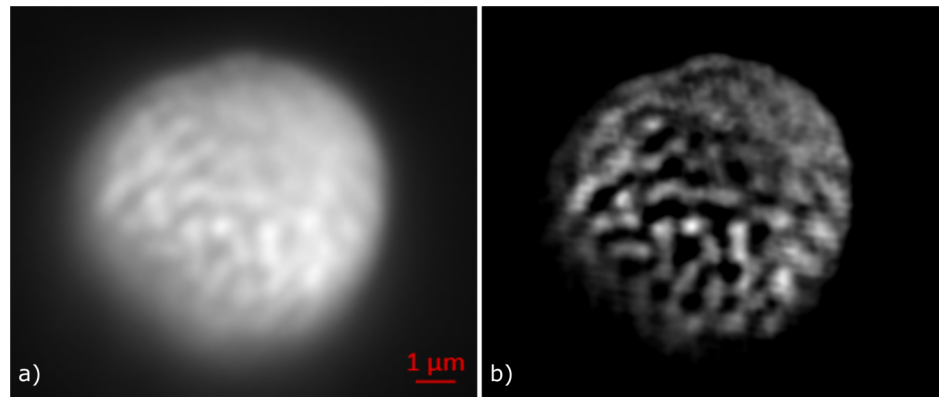


Abbildung 5.10: Pseudo-Weitfeld (a) und SIM-Bild (b) des freien Chloroplasts. SIM erhöht deutlich die laterale Auflösung und beinhaltet deutlich weniger Licht aus anderen Schichten, die nur als unscharfer Hintergrund vorhanden sind (Sectioning). Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

5.2.2. Bewegung und deren Artefakte

Falsche 3D-Aufnahme Abbildung 5.11 zeigt das Pseudo-Weitfeld Bild des freien Chloroplastes zweier benachbarter z-Schichten (Distanz 140 nm). Es ist zu erkennen, dass ein Thylakoid die rote Box verlässt. Dies lässt sich nicht durch eine Defokussierung der Struktur erklären. Eine gute PSF führt nicht zu einer Verschiebung des Objektes, sondern lediglich zu einer Verbreiterung, wenn das Objekt nicht im Fokus ist. Abbildung 5.11 b) zeigt die Ortsänderung der einzelnen Thylakoiden, welche bis zu 200 nm beträgt. Es ist ersichtlich, dass die Bewegung überwiegend aus einer Rotation (um den blauen Mittelpunkt) besteht.

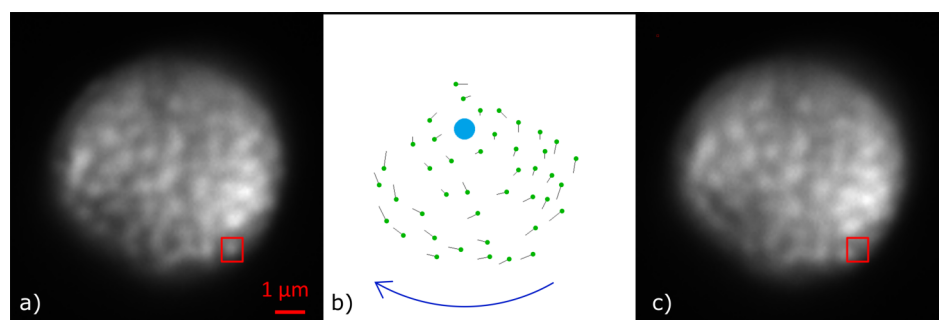


Abbildung 5.11: Vergleich zweier benachbarter Schichten des Pseudo-Weitfeld Bildes des freien Chloroplasts (links und rechts). Anhand der Thylakoiden innerhalb des Chloroplastes kann man die Bewegung sehr gut erkennen. Die Bewegung eines jeden einzelnen Thylakoiden ist dargestellt (Mitte). Vom grünen Startpunkt ausgehend dreht sich die Struktur um das Rotationszentrum (blau). Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

Demnach, ist die 3-dimensional Form des ganzen Chloroplasts falsch dargestellt, da die erläuterte Bewegung zwischen den einzelnen Schichten in den Rohdaten in das SIM-Bild übertragen werden. Eine ähnliche Studie wie die von Rumak et al. über die Form von Chloroplasten ist damit mit SIM schwierig, solange diese nicht fixiert sind [68].

Falsche Hochauflösung in einer Ebene Ein Chloroplast ist eine sehr große Struktur und dementsprechend langsam. Die Abbildung von (zu) schnellen Objekten kann an den individuellen Thylakoiden studiert werden. Abbildung 5.12 zeigt einen Ausschnitt aus dem Weitfeld und SIM-Bild mit einem Bead. Hier sind Bewegungsartefakte deutlich zu erkennen. Aus der punktähnlichen klassischen Abbildung (a) wird eine desaströse Abbildung durch SIM (b). Es entsteht ein völlig falscher Eindruck vom Objekt und der Nutzer sollte unbedingt auf die durch Bewegung bedingte wahrscheinliche Fehlrekonstruktion hingewiesen werden.

Die Form des Artefaktes stimmt mit den theoretischen Betrachtungen aus Gl. 3.38 überein:

$$\sum_m M_{n'm}^{-1} \sum_n M_{mn} L_n \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \quad (5.1)$$

Die horizontalen Streifen im SIM-Bild sind die nicht vollständig separierten Beleuchtungsgitter. Im SIM-Bild unten rechts sind weitere Streifen zu erkennen. Es ist zu vermuten, dass diese aus der Abbildung des gleichen Beads mit der ersten Gitterrichtung stammen. Dafür spricht, dass zum einen der Winkel zwischen beiden Streifen näherungsweise 60° entspricht.

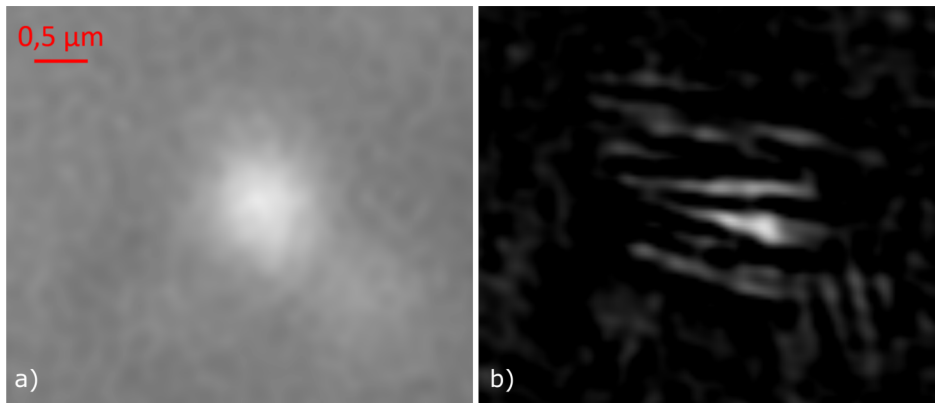


Abbildung 5.12: *Pseudo-Weitfeld und SIM-Bild eines frei beweglichen Fluorophors. Während das Weitfeldbild den Bead sehr verschwommen darstellt ($FWHM \approx 500 \text{ nm}$) (a), entstehen bei der SIM-Rekonstruktion erhebliche Bewegungsartefakte (b). Die zu sehenden Streifen entsprechen den theoretischen Erwartungen eines Bewegungsartefaktes. Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.*

Würde der Bead die dargestellte ROI nicht verlassen, so würden sich die Streifen der drei Richtung zu einer wabenähnlichen (engl.: honeycomb) Struktur summieren.

5.2.3. Visualisierung der Bewegungsdetektion

Abbildung 5.13 zeigt die einzelnen Schritte der Bewegungsdetektion, welche in Kapitel 4 dargestellt sind. Bild (a) zeigt das Weitfeld Bild mit dem freien Chloroplast oben und der Spaltöffnung unten. Durch Gl. 4.25 entsteht daraus das Differenzbild $\Delta(\vec{r})$ (e). Das Differenzbild zeigt deutlich das Chloroplast, was für dessen Bewegung spricht. Im Gegensatz dazu ist die Spaltöffnung fast völlig verschwunden. Bild (b) zeigt die Varianz des Differenzbildes $\sigma^2[\Delta(\vec{r})]$. Bild (f) ist der z-score, welcher aus (b) und (e) durch Gl. 4.39 bestimmt wird. Der Unterschied zum Differenzbild ist gering. Die dunklen Fluorophore heben sich ein bisschen besser vom Hintergrund ab. Zudem ist die fixierte Spaltöffnung nun gar nicht mehr zu sehen. Die Faltung mit der PSF (Gl. 4.42) erhöht das SNR erheblich. Dies hebt insbesondere dunkle Fluorophore vom Hintergrund ab. Die Schwellwertbildung des z-scores zeigt nun Bewegung in weiß. Eine anschließende Erosion entfernt *Salt-and-Pepper Rauschen* [55]. Auffällig ist, dass einige Beads zwar ein deutliches Signal im Differenzbild zeigen, dies aber von einem dunklen Streifen durchzogen ist (g - unten rechts). Dies ist der Nulldurchgang bei der Bewegung eines Teilchens, welcher für eine 1-dimensionale Abbildung in der Simulation von Abb. 4.3 ebenfalls zu finden ist. Daher wird eine Dilatation durchgeführt, um diese Nulldurchgänge auch als Bewegung zu detektieren und um mehrere sich bewegendende Objekte zu einem großen Gebiet zusammenzuführen. Die Grenze dieses Gebiet wird im Folgenden als rote Linie dargestellt und markiert die Bewegungsartefakte im hochauflösten SIM-Bild (h) und im Weitfeld-Bild (a).

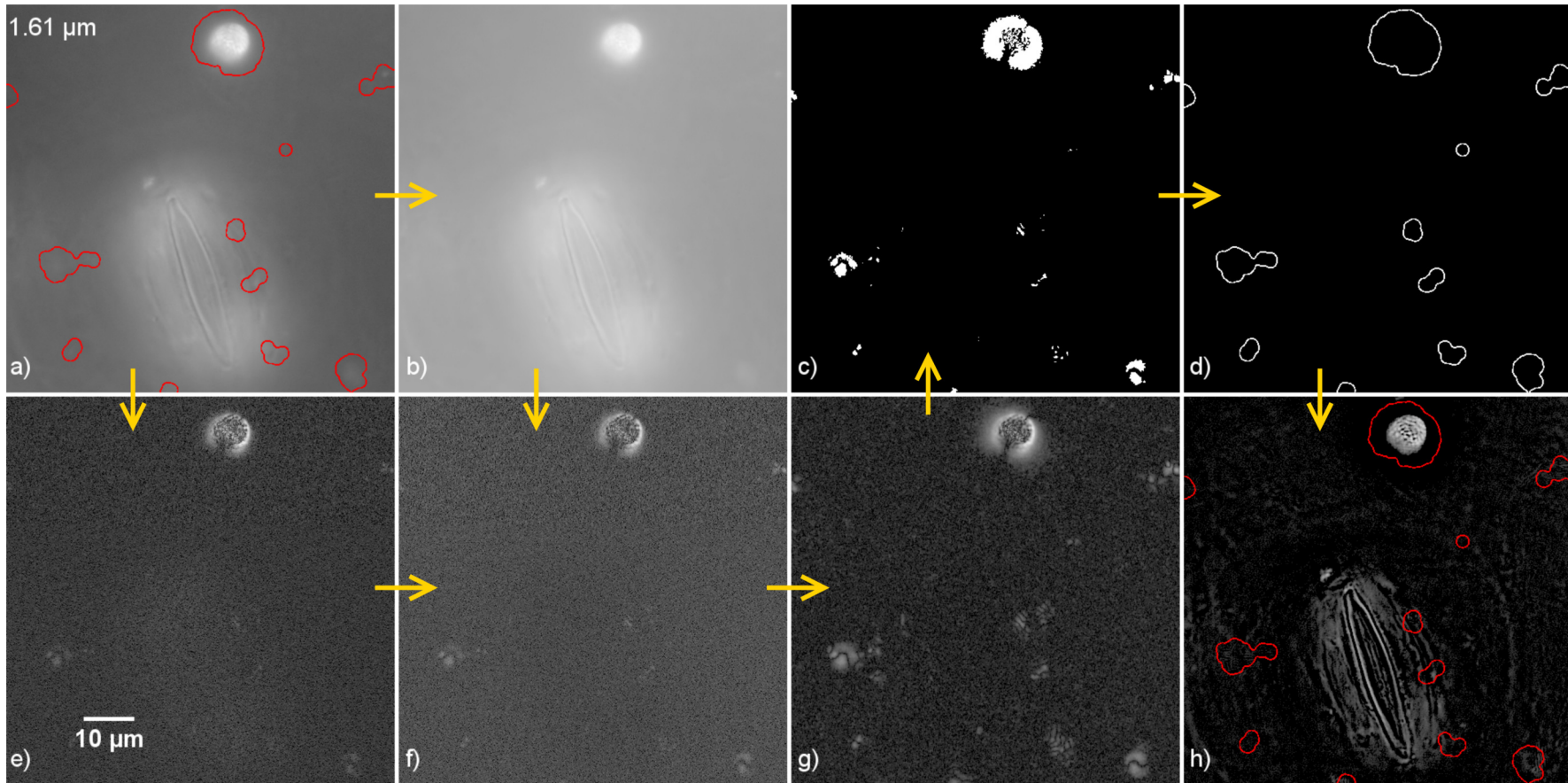


Abbildung 5.13: Visualisierung der einzelnen Schritte der Bildverarbeitung ($\gamma = 0,35$ für besseren Kontrast): a) Pseudo-Weitfeld Bild $D_{\text{odd}}^{IL}(\vec{r})$ - Bereiche mit Bewegungsartefakten sind rot markiert; e) Differenzbild $|\Delta(\vec{r})|$; b) dessen Standardabweichung $\sigma[\Delta(\vec{r})]$; f) z-score $z(\vec{r})$; g) gefilterter z-score $z_h(\vec{r})$; c) Schwellwertbildung $z_h(\vec{r}) > 6.5$; d) Grenzen der Bewegungsbereich erstellen; h) SIM-Bild: Bereiche mit Bewegungsartefakten sind rot markiert. Angepasst mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

Abbildung 5.14 zeigt das SIM-Bild des Chloroplasts (a) und der Spaltöffnung (b)^[23]. Die Hochauflösung wird im Vergleich zum Weitfeldbild in Abb. 5.9 deutlich. Die Bewegung des freien Chloroplastes wird in (a) detektiert. Damit erkennt und lokalisiert der Algorithmus vollautomatisch die in Abschnitt 5.2.2 mühsam per Hand festgestellte Bewegung. Zudem werden die einzelnen Thylakoide detektiert. Auch dies geschieht vollautomatisch und in Übereinstimmung mit denen in Abschnitt 5.2.2 gezeigten Artefakten. Die Bewegung des Chloroplastes wird in (b) nur teilweise detektiert. Die Ursache dafür liegt darin, dass das Chloroplast hier außerhalb des Fokus liegt und damit unscharf abgebildet wird. Durch die unscharfe Abbildung gehen sämtliche Details innerhalb des Chloroplastes verloren, sodass dessen Bewegung nicht sensitiv detektiert wird. Nur die Membran (die Grenze) des Chloroplastes wird abgebildet. Diese wird auch in Bewegungsrichtung detektiert. Die Spaltöffnung, welche durch die umliegenden Zellen fixiert ist, zeigt keine Bewegung. Dies demonstriert, dass der Algorithmus nicht nur sich bewegende Objekte detektiert, sondern auch stationäre Objekte als solche erkennt. Empirisch wurde der Schwellwert des z-scores zu 6.5 bestimmt. Trotzdem muss festgestellt werden, dass große und hell sich bewegende Objekte - wie der Chloroplast - ihre Umgebung überstrahlen, sodass auch dort eine Bewegung detektiert wird, obwohl dort nichts ist (a).

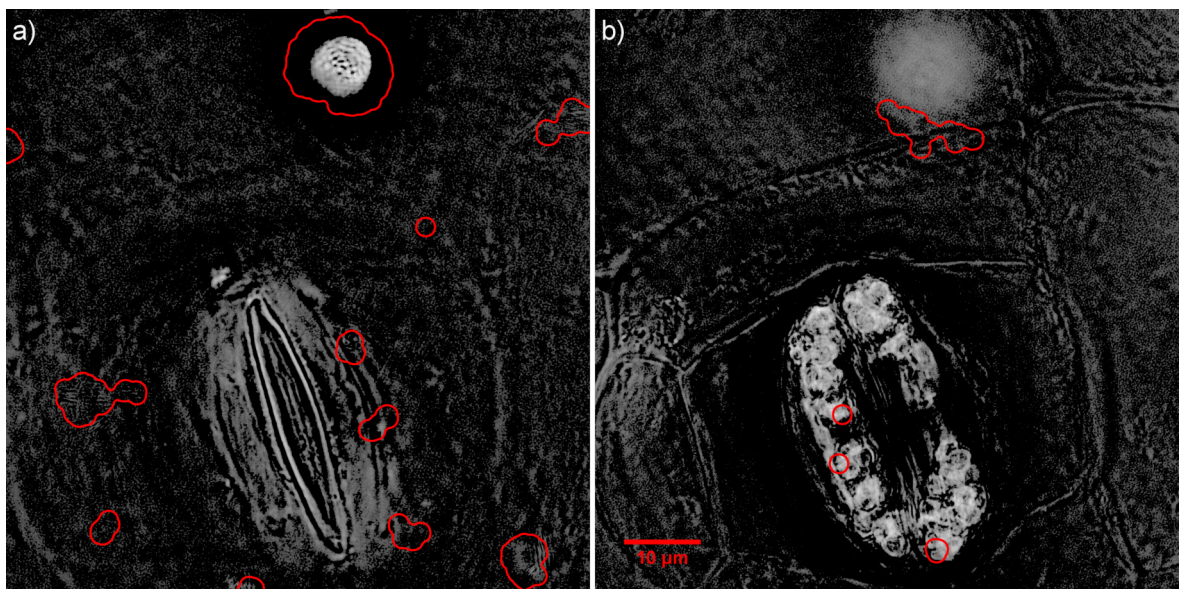


Abbildung 5.14: SIM-Bild mit Spaltöffnung (links) bzw. freiem Chloroplasten (rechts) in Fokus. Bereiche mit Bewegungsartefakten sind detektiert und mit rot markiert ($\gamma = 0.25$ für besseren Kontrast). Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

²³Die Streuung von fluoreszentem Licht an den Zellmembranen macht diese sichtbar, obwohl diese selbst nicht fluoreszieren.

5.3. Schwachpunkte des z-scores

Die vorgestellte Methode des z-scores ist in der Lage stationäre von sich bewegenden Objekten zu unterscheiden. Nichtsdestotrotz, ist die Schwellwertbildung des z-scores nicht quantitativ an ein maximal zulässiges Artefakt gebunden. Zudem ist nicht geklärt, bis zu welcher Geschwindigkeit ein Objekt artefaktfrei abbildbar ist. Eine genauere Betrachtung des Schwellwertes ist notwendig, sodass der Algorithmus diesen bestmöglich - eventuell abhängig von der Probe - automatisch optimiert.

5.4. Simulation einer SIM-Aufnahme mit bewegten Beads

Um die Bewegungsgeschwindigkeit mit dem entstehenden Artefakt zu verknüpfen, dient ein 3D-Testobjekt mit $512 \times 512 \times 20$ Voxeln. Das laterale und axiale Sampling beträgt hierbei 40 bzw. 110 nm und damit doppelt so fein wie in klassischer Mikroskopie. Das Objekt besteht aus 25 Beads in der mittleren z-Schicht, welche in Abb. 5.15 dargestellt ist. Die Untersuchung von Punktquellen ist ausreichend, da SIM eine inkohärente Bildgebung ist und die Bildverarbeitung weitestgehend linear ist. Komplexere Objekte und deren Rekonstruktion können als Linearkombination dieser Punktquellen dargestellt werden. Jeder der Beads bewegt sich geradlinig (hier entlang der horizontalen x-Achse) mit seiner eigenen individuellen und konstanten Geschwindigkeit (Abb. 5.15 - rechts). Der Bead links oben ist stationär und dient somit durch seine ideale Abbildung später als Referenz. Eine axiale Bewegung wird nicht untersucht. Shao et al. zeigten, dass diese lediglich zu einer axialen Streckung bzw. Kompression der PSF führt. Bewe-

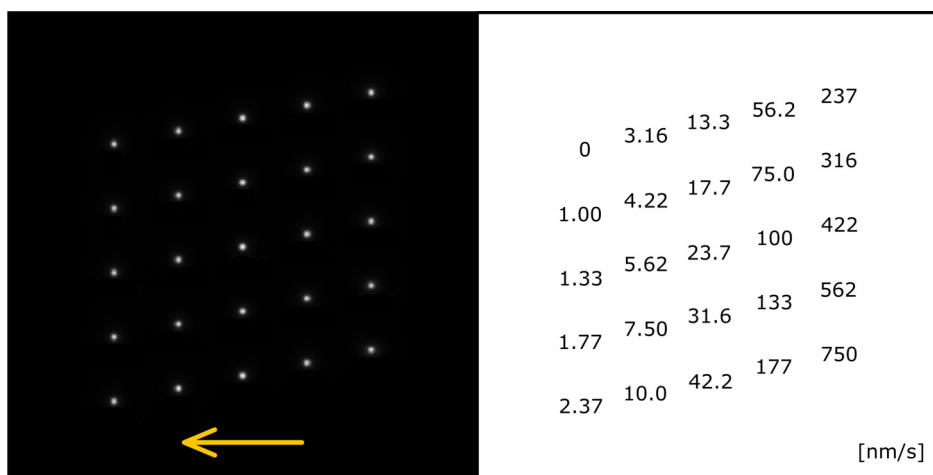


Abbildung 5.15: Links: Mittlere Schicht des Testobjektes. 25 Punktquellen bewegen sich horizontal. Jeder Punkt hat dabei seine individuelle konstante Geschwindigkeit (rechts). Der Punkt oben links ist fixiert und dient später als Referenzobjekt.

gungsartefakte entstehen hierbei nicht [33]. In der Praxis ist davon auszugehen, dass sich Geschwindigkeit und Richtung des Objektes ändern. Dieser Effekt ist hier vernachlässigt um die Anzahl der Parameter überschaubar zu halten. Gerechtfertigt ist dies durch den Gedanken, dass eine gleichmäßige Bewegung immer zu einer größeren Ortsänderung und damit zu stärkeren Artefakten führt, als jede andere zufällige Bewegung mit geringerer Maximalgeschwindigkeit.

Um die global maximal mögliche Geschwindigkeit von SIM zu bestimmen, werden für die Simulation der SIM-Aufnahme die Parameter des schnellsten verfügbaren SIM-Aufbaus - dem fastSIM verwendet (Belichtungszeit: 10 ms; Phasenschritt 0.434 ms; Fokussierung 20 ms [RF2], [RF3]). Weitfeld und SIM-Bilder sind mit einer Wiener Entfaltung, welche auf den fixierten Bead optimiert ist, verbessert. Das rekonstruierte SIM-Bild eines Beads mit Geschwindigkeit v an der Fokusposition z wird im Folgenden als $B^{v,z}(x,y)$ bezeichnet.

Das Resultat ist für den Fokus in Abb. 5.16 dargestellt. Neben der Auflösungssteigerung durch SIM ist auch das Auftreten von Artefakten mit zunehmender Geschwindigkeit zu sehen. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass eine Bewegung im Weitfeld

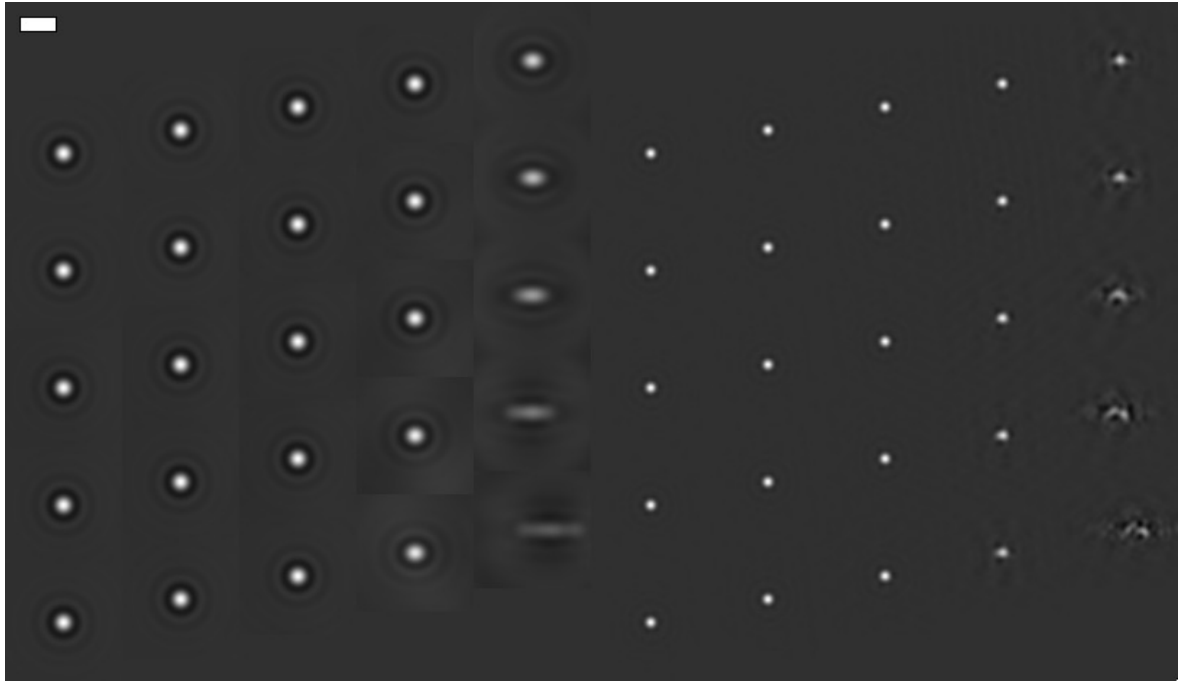


Abbildung 5.16: Entfaltetes Weitfeld (links) und SIM-Bild (rechts) des Testobjektes in Fokus. Mit zunehmender Geschwindigkeit nehmen auch die Bewegungsartefakte zu. Während die Abbildung im Weitfeld nur zu einer Spur führt, entstehen in SIM komplexe Artefakte. Für eine bessere Sichtbarkeit der Artefakte sind die Bilder der einzelnen Punkte vergrößert. (Balken = 1 μm)

„lediglich“ zu einer Streckung bzw. Spur des Beads führt, während die gleiche Bewegung in SIM zu starken Artefakten führt.

Weitfeld und SIM-Bild bei einer Defokussierung von 110 nm sind in Abb. 5.17 dargestellt. Es ist sehr gut zu erkennen, dass die SIM-Aufnahme ein deutlich besseres Sectioning hat, da die Abbildung der Beads bei einem Defokus von 110 nm deutlich dunkler ist, als im Weitfeld.

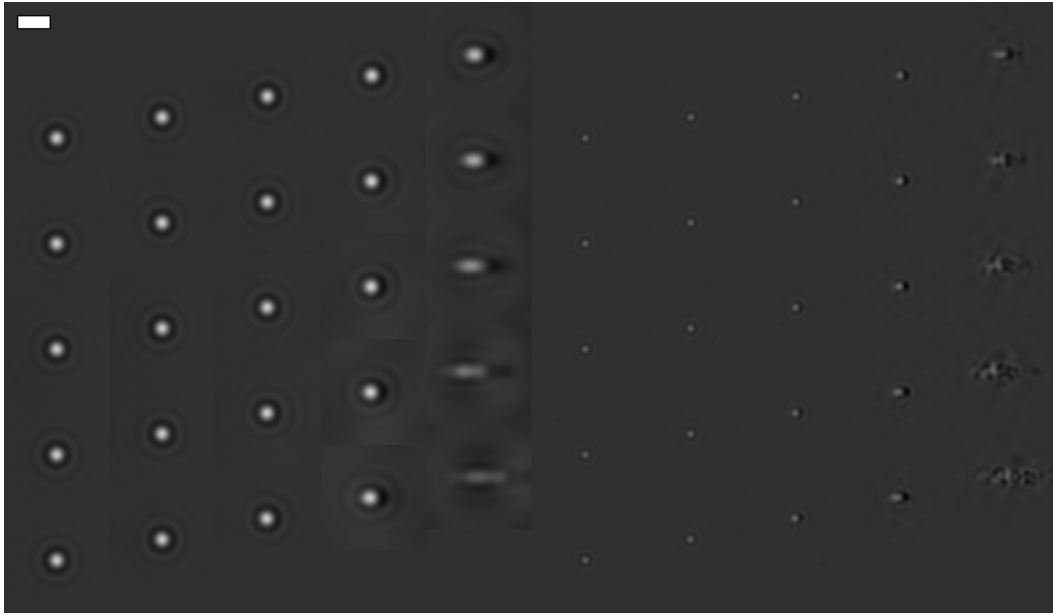


Abbildung 5.17: Entfaltetes Weitfeld (links) und SIM-Bild (rechts) des Testobjektes 110 nm außerhalb des Fokus. Das Sectioning von SIM ist deutlich zu erkennen, da das SIM-Bild deutlich dunkler ist. Zudem ist im Vergleich mit Abb. 5.16b) zu erkennen, dass Bewegungsartefakte in SIM schon bei langsameren Geschwindigkeiten auftreten, wenn die Struktur außerhalb des Fokus ist. (Balken = 1 μm)

5.5. Photonenabhängigkeit des z-scores

5.5.1. Theoretisches Verhalten

Die Abhängigkeit der FDM von der Anzahl der Photonen soll im Folgenden untersucht werden. Dafür sind die beiden Objekte $\varrho_{\text{even/odd}}(\vec{r})$, die das Objekt bilden, auf 1 normiert, sodass der später eingefügte Faktor N die Anzahl der Photonen widerspiegelt. Hat sich die Probe zwischen der Aufnahme der beiden Bilder um \vec{d} verschoben, so gilt:

$$\varrho_{\text{even}}(\vec{r} - \vec{d}) = \varrho_{\text{odd}}(\vec{r}) \quad (5.2)$$

Wieder ist die Anzahl der Photonen N hoch genug, um das Photonenrauschen durch die Normalverteilung $\mathcal{N}(\mu, \sigma^2)$ zu nähern. Der gemessene Wert in jedem Pixel in $D_{even/odd}$ ist daher:

$$D_{even/odd}(\vec{r}) \propto \mathcal{N}\left\{\mu_{even/odd}(\vec{r}) = N \cdot [\varrho_{even/odd} \otimes h](\vec{r}), \sigma_{even/odd}^2 = \mu_{even/odd}(\vec{r})\right\} \quad (5.3)$$

Das Differenzbild $\Delta(\vec{r})$ ist demnach ebenfalls normalverteilt und es gilt:

$$\begin{aligned} \Delta(\vec{r}) &= D_{even}(\vec{r}) - D_{odd}(\vec{r}) \\ \Delta(\vec{r}) &\propto \mathcal{N}\left\{\mu_{\Delta} = \mu_{even}(\vec{r}) - \mu_{odd}(\vec{r}), \sigma_{\Delta}^2 = \sigma_{even}^2 + \sigma_{odd}^2\right\} \\ \Delta(\vec{r}) &\propto \mathcal{N}\left\{N \cdot [\{\varrho_{even}(\vec{r}') - \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r}), N \cdot [\{\varrho_{even}(\vec{r}') + \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r})\right\} \end{aligned} \quad (5.4)$$

Der z-score normalisiert das Rauschen des Differenzsignals auf die Varianz 1, durch die Division mit der (geschätzten) Standardabweichung $\sigma_{\Delta}(\vec{r})$. Der Erwartungswert des z-scores ist damit proportional zu \sqrt{N} und damit abhängig von der Anzahl der Photonen:

$$z(\vec{r}) \propto \left| \frac{\Delta(\vec{r})}{\sigma_{\Delta}(\vec{r})} \right| = \left| \mathcal{N}\left\{ \frac{\mu_{\Delta}(\vec{r})}{\sigma_{\Delta}(\vec{r})}, \frac{\sigma_{\Delta}^2(\vec{r})}{\sigma_{\Delta}^2(\vec{r})} \right\} \right| \quad (5.5)$$

$$= \left| \mathcal{N}\left\{ \sqrt{N} \frac{[\{\varrho_{even}(\vec{r}') + \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r})}{\sqrt{[\{\varrho_{even}(\vec{r}') - \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r})}}, 1 \right\} \right| \quad (5.6)$$

5.5.2. Experimenteller Nachweis

Der bisherige Algorithmus der Bewegungsdetektion wurde auf die simulierten SIM-Aufnahmen angewandt und der z-score für jeden einzelnen Bead analysiert. Da jeder Bead auf mehrere Pixel abgebildet wird, so wird der Maximalwert des z-scores in einer Umgebung von $((81 \cdot 81) \text{ px} = (3,24 \cdot 3,24) \mu m^2)$ bestimmt. Die Größe des Bereiches ist so gewählt, dass auch der schnellste Bead diesen während der Aufnahme nicht verlässt. Zusätzlich existieren noch die drei Gitterrichtungen in der Beleuchtung, sodass auch noch über diese Dimension der Maximalwert extrahiert werden muss. Daher ist der z-score eines Beads das Maximum aus insgesamt $81 \cdot 81 \cdot 3 = 19.683$ individuellen z-scores und wird im Folgenden „ultimate z-score“ z^{ult} genannt. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung des z-scores für stationäre Beads ($\varrho_{even} = \varrho_{odd}$ in Gl. 5.6) entspricht $|\mathcal{N}\{0, 1\}|$. Dadurch kann das Hintergrundrauschen der Messmethode bestimmt werden. Dafür wird das Zufallsexperiment $|\mathcal{N}\{0, 1\}|$ mit den oben erklärten 19.683 Versuchen simu-

liert und der Maximalwert z^{ult} bestimmt. Diese ganze Messreihe wurde 10.000-mal wiederholt um den Fehler abschätzen zu können. Das Hintergrundrauschen von z^{ult} n_{floor} ergibt sich zu:

$$n_{floor} = 4,2 \pm 0,3 \quad (5.7)$$

Abbildung 5.18 zeigt z^{ult} der einzelnen Beads in Abhängigkeit von deren Geschwindigkeit v und der gemessenen Anzahl von Photonen N . In Übereinstimmung mit den theoretischen Überlegungen die zu Gl. 5.6 führten, steigt der z-score mit der Geschwindigkeit und der Helligkeit an. Das theoretisch vorhergesagte Hintergrundrauschen n_{floor} (in orange) tritt für quasi-stationäre Proben ein. Das Artefakt selbst hängt jedoch nicht von der Helligkeit des sich bewegenden Objektes ab. Diese ist ausschließlich ein Skalierungsfaktor der Intensität. Die Abhängigkeit des ultimate z-score von der Helligkeit des Beads sorgt dafür, dass vernachlässigbare aber sehr helle Artefakte detektiert werden, während gravierende aber dunkle Artefakt übersehen werden. Die Abhängigkeit des z-scores von der Helligkeit der Probe muss (für die relevanten hohen Geschwindigkeiten) aufgehoben werden.

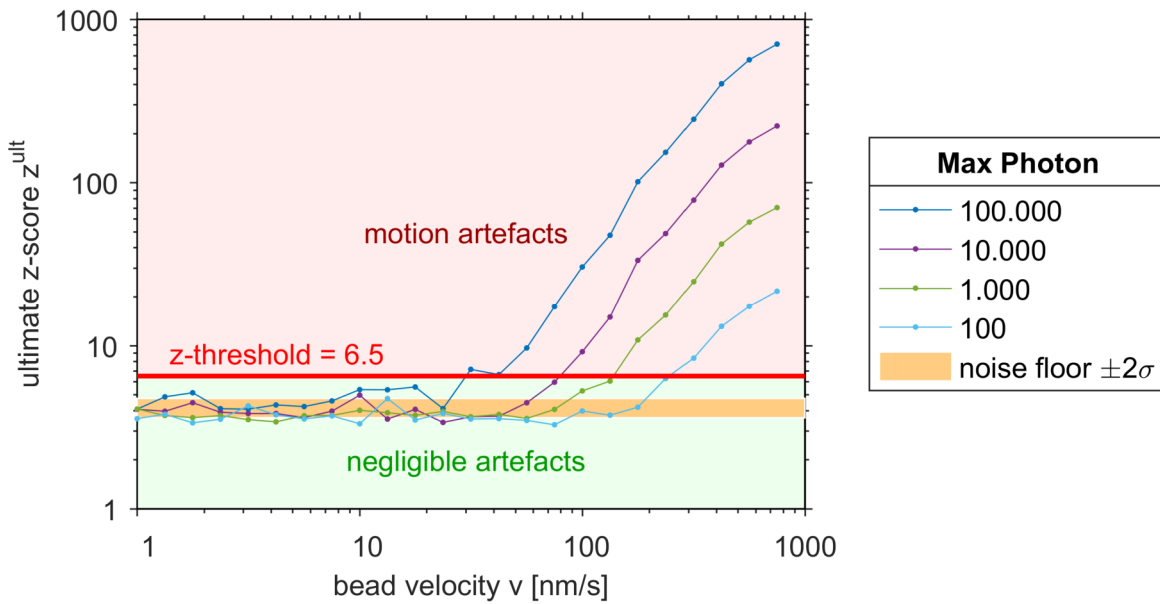


Abbildung 5.18: Der (ultimate) z-score eines Beads hängt sowohl von der Geschwindigkeit auch als von der Anzahl von Photonen ab. Daher kann aus dem z-score nicht direkt auf die Geschwindigkeit geschlossen werden. Die Schwellwertbildung bei 6,5 ist demnach kein Schwellwert bei einer festen maximal zulässigen Geschwindigkeit. Langsame (vernachlässigbare Artefakte) aber helle Beads werden unnötigerweise als Bewegungsartefakt markiert (dunkelblau), während sehr schnelle (Bewegungsartefakte) aber dunkle Beads nicht detektiert werden (hellblau). Lediglich bei sehr langsamen Bewegungen ist der z-score photonenunabhängig.

Die empirische Schwellwertbildung des z-scores bei 6,5 zur Bewegungsdetektion ist keine Operation die eine maximale Geschwindigkeit oder ein maximal zumutbares Artefakt zulässt. Es muss definiert werden, welche Artefakte zumutbar sind, bei welchen Geschwindigkeiten sie entstehen und zu welchem z-score solch eine Bewegung führt.

6. Bewegungsartefakte in SIM

6.1. Artefakte in SIM - Verformung und Scherung

Die Rekonstruktion eines sich bewegenden Beads zeigt Artefakte, welche mit zunehmender Geschwindigkeit stärker werden. Die artefaktbehaftete Abbildung eines Beads kann einfach entdeckt und analysiert werden, wenn klar ist, dass es sich tatsächlich um einen Bead handelt. Bei einer Abbildung einer komplexeren Objektstruktur ist es unmöglich zwischen Artefakt und realer Hochauflösung zu unterscheiden [24, 32, 44]. Es gibt hierbei zwei Klassen von Artefakten. Zum einen kann es sich um eine Verformung innerhalb einer Fokusschicht handeln. Dies führt zumeist zu einer Fehlinterpretation der Daten. Zum anderen kann es zu einer Scherung, also zu einem lateralen Versatz einzelner Fokusschichten kommen. Die stört meist den Bildeindruck und kann dadurch meist leicht erkannt werden.

6.2. Messung von Artefakten

Bewegungsartefakte können durch das oben eingeführte Testbild analysiert werden, indem Form (Verformung) und der Mittelpunkt (Scherung) vom Bild eines sich bewegenden Beads $B^{v,z}$ mit dem Bild des stationären Referenzbeads $B^{v=0,z}$ verglichen werden. Dies geschieht durch eine „normalisierte Kreuzkorrelation“ (NCC) $\Gamma^{v,z}$ für jede Geschwindigkeit v und in jeder Fokus Schicht z . Hierbei kennzeichnet $*$ den Operator der Kreuzkorrelation und $\langle \rangle_{xy}$ ist der Erwartungswert einer Größe über x und y . Die hier dargestellten simulierten Daten erfüllen die Kriterien zur Ausführung einer NCC, da Vergrößerung ($= 1$), Rotation ($= 0$) und abbildendes System gleich sind. Die Bilder der Beads $B^{v,z}$ müssen im Vorfeld zu $B_{norm}^{v,z}$ normiert werden [69]:

$$\Gamma^{v,z}(x,y) = B_{norm}^{v,z}(x,y) * B_{norm}^{v=0,z}(x,y) \quad (6.1)$$

$$\text{mit: } B_{norm}^{v,z}(x,y) = \frac{B^{v,z}(x,y) - \langle B^{v,z} \rangle_{xy}}{\sqrt{\sum_{\forall x'} \sum_{\forall y'} (B^{v,z}(x',y') - \langle B^{v,z} \rangle_{xy})^2}} \quad (6.2)$$

$$(6.3)$$

Eine 2-dimensional Gaußkurve $\Theta^{v,z}$ wird an jede NCC $\Gamma^{v,z}$ gefittet. Dadurch das Maximum der NCC ($\zeta^{v,z}$) sowie dessen Position ($x_0^{v,z}; y_0^{v,z}$) bestimmt werden kann. Der Fit ist notwendig, da das Maximum der NCC in der Regel zwischen den Pixeln liegt. Der Fit erfolgt iterativ um das Maximum bestmöglich zu bestimmen. Besondere Auf-

merksamkeit erhält hierbei das Maximum $\zeta^{v,z}$ was im Folgenden als „Similarity“ oder „Similarity-value“ bezeichnet wird.

$$\Theta^{v,z} = \zeta^{v,z} \cdot e^{\frac{(x-x_0^{v,z})^2 + (y-y_0^{v,z})^2}{(\sigma^{v,z})^2}} + c \quad (6.4)$$

Aufgrund der vorherigen Normalisierung liegt die Similarity stets zwischen 1 und -1 . Dabei gilt für die Werte: 1 (Identität/ keiner Verformung), 0 (vollständig Deformiert, keine Ähnlichkeit vorhanden) und -1 (ideale Antikorrelation). Dadurch ist es der NCC möglich eine beliebige Verformung in eine messbare Größe - der Similarity - umzuwandeln [69].

6.3. Zulässige Artefakte und deren Geschwindigkeiten in SIM

6.3.1. Verformung - Toleranz Limit

Es lässt sich definitiv darüber streiten, welche Verformung in der Abbildung eines Beads als geringfügig und damit vernachlässigbar angesehen werden können. Eine Möglichkeit entsteht hierbei durch das Sparrow Kriterium zur Definition der Zweipunktauflösung. Nach Sparrow sind zwei individuelle Beads genau dann aufgelöst, wenn sich in ihrer Abbildung ein Intensitätsabfall zwischen ihnen befindet (Abb. 6.1). Ist kein Intensitätsabfall zu verzeichnen, so werden beide Beads als ein einziger aufgefasst.

Das weit verbreitet und erfolgreiche Sparrow-Kriterium setzt daher einen Maßstab welche Artefakte als geringfügig eingestuft werden, wenn es zwei zu dicht liegende Beads schlicht als einen auffasst. Daher ist es gerechtfertigt zu sagen, dass die maximal

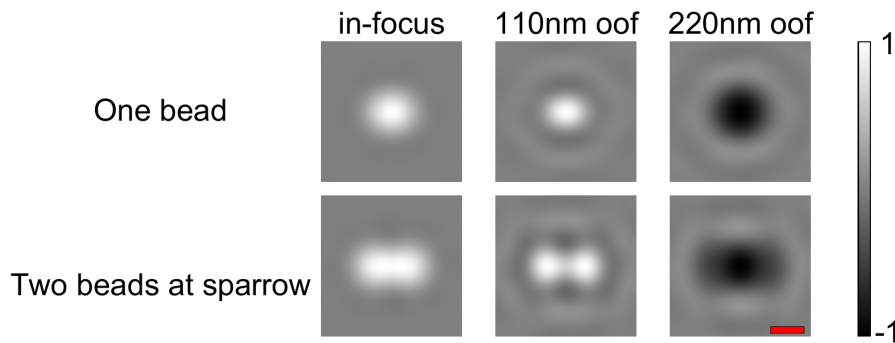


Abbildung 6.1: Simulierte SIM-Bild eines einzelnen Beads (oben) und zweier Beads am Sparrow-Limit (Distanz = 101 nm) (unten). Das Objekt ist hierbei in Fokus (links); 110 nm außerhalb (mitte) und 220 nm außerhalb (rechts). Der rote Balken unten rechts entspricht 100 nm. Für bessere Sichtbarkeit sind die Bilder innerhalb jeder Spalte auf das Maximum 1 (links und mitte) bzw. -1 (rechts) normiert. (oof (engl.: out-of-focus))

mögliche Verformung - bzw. der größte erlaubte Abfall der Similarity - festgelegt wird durch die Similarity zweier Beads am Sparrow-Limit und einem einzelnen Bead.

Abbildung 6.2 zeigt den axialen Verlauf der Similarity am Sparrow-Limit. Unglücklicherweise hängt die Korrelation und somit die Similarity vom Fokus ab. In der Abbildung einer unbekannten Probe ist die axiale Position dieser jedoch nicht bekannt. Daher sollte das Kriterium keine axiale Abhängigkeit haben. Um jegliche Verformung unabhängig von deren axialer Position zu detektieren, wird ein lokales Maxima der Similarity entlang z verwendet. Dadurch wird jede Verformung die diese Grenze nicht überschreitet, keine schlimmeren Artefakte hervorrufen, als das zusammenfassen zweier Beads am Sparrow-Limit zu einem Einzigen. Im Fokus ist die Similarity 0,89 und formt ein lokales Maximum. Einige andere lokale Maxima sind zwar geringfügig höher, sind andererseits aber schon deutlich außerhalb des Fokus (bei $z \approx 190$ nm und 310 nm). Durch das Sectioning der SIM-PSF nimmt die Intensität außerhalb des Fokus jedoch schnell ab (grüne Kurve), sodass diese lokalen Maxima wenig Intensität zum Bild beitragen (23% bzw. 14%). Daher wird der Wert von 0,89 im Folgenden als „Similarity-Schwellwert“ verwendet.

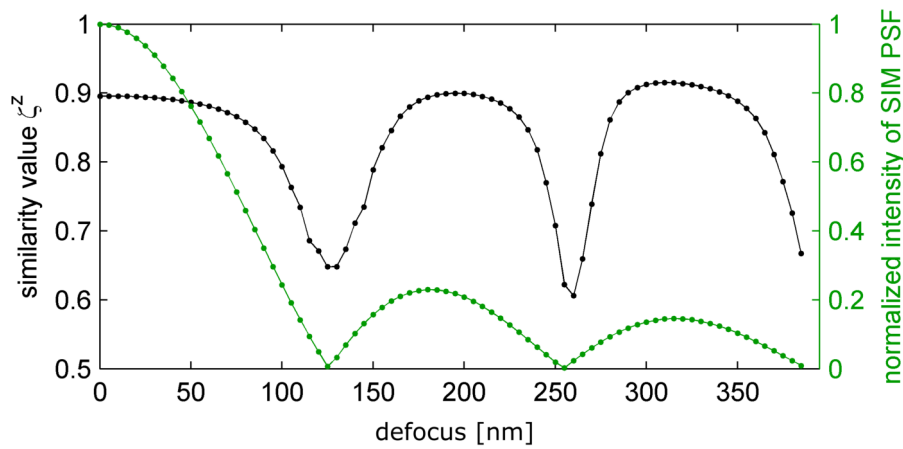


Abbildung 6.2: Schwarz: Similarity zwischen der Abbildung zweier Beads am Sparrow-Limit und der eines einzelnen Beads in Abhängigkeit des Fokus (kein Rauschen). Der Schwellwert der Similarity ist durch die Similarity im Fokus - einem lokalen Maximum - zu 0,89 definiert. Andere Similarity-Werte sind höher, aber deutlich außerhalb des Fokus, weshalb sie durch das Sectioning im SIM deutlich dunkler im Bild sind (grüne Kurve)

6.3.2. Verformung - zulässige Geschwindigkeit

Abbildung 6.3 verknüpft die Verformung - repräsentiert durch die Similarity $\zeta^{v,z}$ - mit der in der Simulation bekannten Geschwindigkeit v der Beads. Die rote Linie ist der

Similarity-Schwellwert. Solange der bestimmte Wert $\zeta^{v,z}$ eines Beads darüber liegt, ist seine Abbildung artefaktfrei. Die Fehlerbalken entstehen durch wiederholtes Simulieren der SIM-Aufnahme mit verschiedenen lateralen Richtungen der Bewegung der Beads. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmender Geschwindigkeit die Similarity abnimmt und damit die Verformung zunimmt. Dies steht in Einklang mit den theoretischen Erwartungen und insbesondere mit dem intuitiven ersten Eindruck der SIM-Bilder in Abb. 5.16. Beads außerhalb des Fokus verlieren schon bei deutlich kleineren Geschwindigkeiten ihre Form. Auch dies steht im Einklang mit den SIM-Bildern in Abb. 5.17.

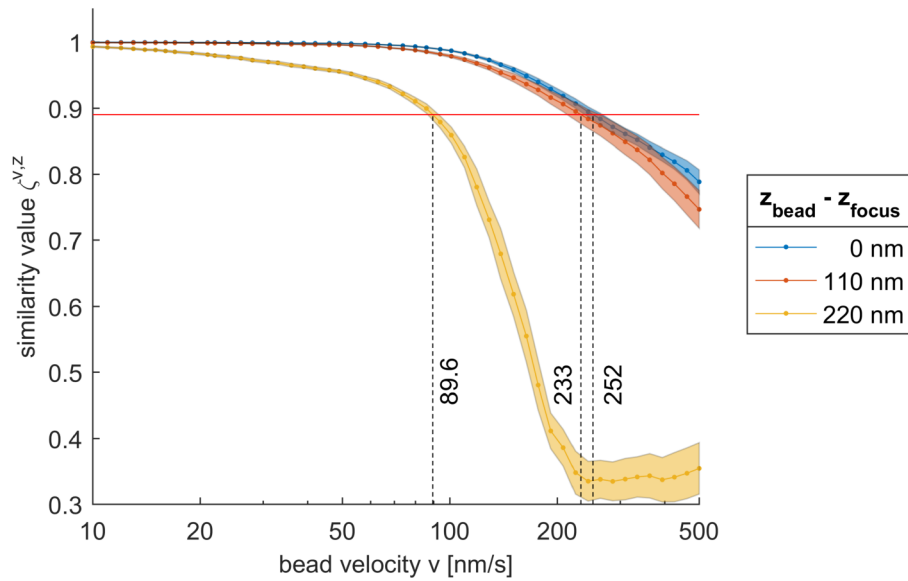


Abbildung 6.3: Similarity zwischen einem bewegten und einem statischen Bead in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit für verschiedene Fokus Positionen. Der Similarity-Schwellwert von 0,89 ist rot eingezeichnet. Je schneller ein Bead ist, desto mehr verliert er seine Form - desto geringer ist die Similarity zur perfekten Abbildung des stationären Beads. Ein Bead im Fokus behält seine Form noch bei den höchsten Geschwindigkeiten bei.

Im Fokus wird ein Bead demnach ohne Verformung abgebildet solange er sich langsamer als $(252 \pm 15) \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bewegt (s. Abb. 6.4). Beads außerhalb des Fokus hingegen dürfen sich nicht schneller als $(238 \pm 25) \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bei 110nm defokus bzw. $(90 \pm 4) \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ bei 220nm defokus sein. Wie bereits diskutiert ist es nicht möglich einen Schwellwert zu definieren, der von der (unbestimmbaren) axialen Position des Objektes abhängt. Ein globales Limit ist daher wieder notwendig. Wird dieser globale Schwellwert durch die geringe Grenzggeschwindigkeit außerhalb des Fokus definiert, so werden schnelle und korrekt abgebildete Objekte im Fokus fälschlicherweise als Artefakt gekennzeichnet. Dies ist unakzeptabel, zumal Objekte mit 220nm defokus auch deutlich dunkler sind und damit

auch die entstehenden Artefakte weniger sichtbar sind (vgl. Abb. 6.2). Grobe Artefakte werden in jedem Fall auch außerhalb des Fokus detektiert. Daher wird als globaler Schwellwert für die zulässige Geschwindigkeit um Verformungen zu unterbinden - der 'Distortion-Threshold-Velocity' (DTV) - der Grenzwert in Fokus von $252 \frac{nm}{s}$ verwendet.

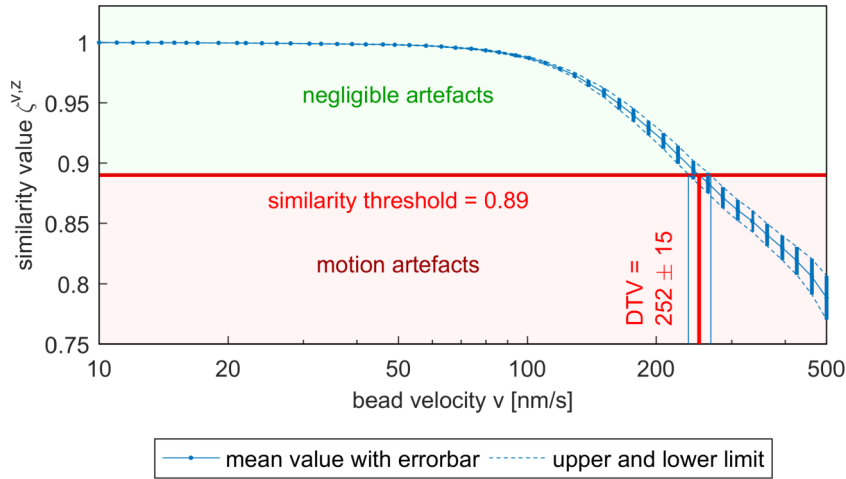


Abbildung 6.4: *Similarity zwischen einem bewegten und einem statischen Bead in Fokus über die Geschwindigkeit des Beads. Der Similarity-Schwellwert (rot) wird bei einer Geschwindigkeit von $252 \frac{nm}{s}$ unterschritten und definiert damit die Distortion-Threshold-Velocity (DTV).*

6.3.3. Scherung - Toleranz Limit

Shao et al. vertreten die Ansicht, dass die Bewegung eines Objektes zu keinem sichtbaren Artefakt in klassischer Weitfeld Mikroskopie führt, wenn die Ortsänderung der Probe während der Aufnahme kleiner ist, als die finale Auflösung des Systems. Dieser Ansatz kann auf SIM angewandt werden, da es sich in der Detektion um eine Weitfeld Technik handelt [33]. Die finale Auflösung kann durch die Halbwertsbreite (FWHM) der SIM-PSF zu $FWHM_{xy}$ genähert werden.

6.3.4. Scherung - zulässige Geschwindigkeit

Da die SIM-PSF eine signifikante axiale Ausdehnung hat, wird ein Objekt in mehreren z-Schichten abgebildet. Die Anzahl an z-Schichten kann durch axiale FWHM der SIM-PSF ($FWHM_z$) und das axiale Sampling z_{sampling} abgeschätzt werden [33]. Hierbei muss

„+1“ addiert werden, da selbst ein axiale Halbwertsbreite von null dazu führt, dass das Objekt in genau einer z-Schicht zu sehen ist:

$$\frac{\text{FWHM}_z}{z_{\text{sampling}}} + 1 = \frac{279\text{nm}}{110\text{nm}} + 1 = 3,5 \Rightarrow 4 \quad (6.5)$$

Das hier simulierte fastSIM-System benötigt $t_{\text{Aufnahme}} = 1.1$ Sekunden um alle notwendigen Bildern in den 4 Fokus Positionen aufzunehmen. Es ergibt sich für die zulässige Geschwindigkeit um Scherung zu unterbinden - der 'Shearing-Threshold-Velocity' (STV):

$$\text{STV} = \frac{\text{FWHM}_{xy}}{t_{\text{Aufnahme}}} = \frac{103\text{nm}}{1,1\text{s}} = 94 \frac{\text{nm}}{\text{s}} \quad (6.6)$$

6.3.5. Maximal zulässige Geschwindigkeit

Der Schwellwert der Scherung ist unter dem für Verformung ($\text{STV} < \text{DTV}$). Dies zeigt, dass eine signifikante Verbreiterung der PSF - und damit eine Reduzierung der Auflösung - geschieht, bevor sich die Abbildung verformt. Das Entstehen von Verformungen geht dreidimensional demnach auch immer mit einer Scherung einher. Artefakte in Form von Verformungen können dadurch grundsätzlich ausgeschlossen werden, indem die STV als Grenzwert dient. Umgekehrt, heißt der Nachweis einer Verformung nicht zwangsweise, dass keine Scherung auftritt. Das Abschätzen der STV ist einfach, während die DTV eine sehr aufwendige Simulation benötigt. Trotzdem lohnt sich der separate Nachweis einer Verformung, da eine Scherung allein den Nutzen eines SIM-Bildes nicht unterbindet. Vor einer auftretenden Scherung sollte der Nutzer lediglich gewarnt werden. Ströhl et al. gaben eine Grenzgeschwindigkeit von $1.500 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$ für einen sich bewegenden Doppelspalt an^[24]. Die Methode von Shao et al. bestimmt die STV jedoch zu $1.200 \frac{\text{nm}}{\text{s}}$. Das Limit von Ströhl et al. ist vermutlich deswegen größer, weil als Testobjekt ein relativ breiter Doppelspalt verwendet wurde. Daher ist eine größere Geschwindigkeit notwendig, damit dessen Auflösung verschwindet. Genau dieser Punkt ist für Ströhl et al. die Grenze zum Artefakt. Aber auch diese Daten zeigen Aberrationen schon bei kleineren Geschwindigkeiten die mit der hier vorgestellten STV gut übereinstimmen [41].

²⁴ $t_{\text{Aufnahme}} = 90\text{ms}$, $\lambda = 512\text{nm}$; $\text{NA} = 1,3$; $k_g = 0,7$; $\text{FWHM}_{wf} = \frac{0,47 \cdot \lambda}{\text{NA}} \approx 185\text{nm}$; $\text{FWHM}_{\text{SIM}} \approx \frac{\text{FWHM}_{wf}}{1+k_g} = 108\text{nm}$).

7. Der normalisierte z-score: Ein photonenunabhängiges Maß für Bewegung

7.1. Normalisierte z-score

Der z-score hängt wie in Gl. 5.6 gezeigt, von der Anzahl der Photonen ab. Die gezeigte Proportionalität von $\propto \sqrt{N}$ kann eliminiert werden, indem der z-score durch \sqrt{N} geteilt wird. Dies wird im Folgenden als „normalisierter z-score“ $z_{norm}(\vec{r})$ bezeichnet [25]:

$$z_{norm}(\vec{r}) = \frac{z(\vec{r})}{\sqrt{N}} = \left| \mathcal{N} \left\{ \frac{[\{\varrho_{even}(\vec{r}') + \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r})}{\sqrt{[\{\varrho_{even}(\vec{r}') - \varrho_{odd}(\vec{r}')\} \otimes h](\vec{r})}}, \frac{1}{N}} \right\} \right| \quad (7.1)$$

In Anlehnung an den ultimate z-score, welcher auf dem z-score beruht, führt der normalisierte z-score zum „ultimate normalisierten z-score“ z_{norm}^{ult} . Die Normalisierung reduziert das Hintergrundrauschen entsprechend. Ausgehend von Gl. 5.6 zeigt sich für stationäre Objekte ($\varrho_1 = \varrho_2$), dass das „ultimate Hintergrundrauschen“ n_{floor}^{ult} wie folgt ist:

$$n_{floor}^{ult}(N) = \frac{n_{floor}}{\sqrt{N}} = \frac{4,2 \pm 0,3}{\sqrt{N}} \quad (7.2)$$

7.2. Umrechnung: Geschwindigkeit & normalisierter z-score

Abbildung 7.1 zeigt z_{norm}^{ult} in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Beads v und der Anzahl Photonen N . Es ist ersichtlich, dass schnelle Bewegungen nun zu einem Signal führen, welches Unabhängig von der Anzahl der Photonen ist. Nun ist es möglich die theoretisch maximal erlaubten Geschwindigkeiten STV(orange) und DTV(rot) in normalisierte z-scores umzurechnen. Dadurch entsteht die Verbindung vom messbaren normalisierten z-score und der den Artefakten zu Grunde liegenden - aber nicht messbaren - Geschwindigkeit. Ausgehend von der STV ergibt sich der „Shearing-Threshold norma-

²⁵Die Anzahl der Photonen N wird experimentell durch die Rohbilder und die Kameraverstärkung abgeschätzt

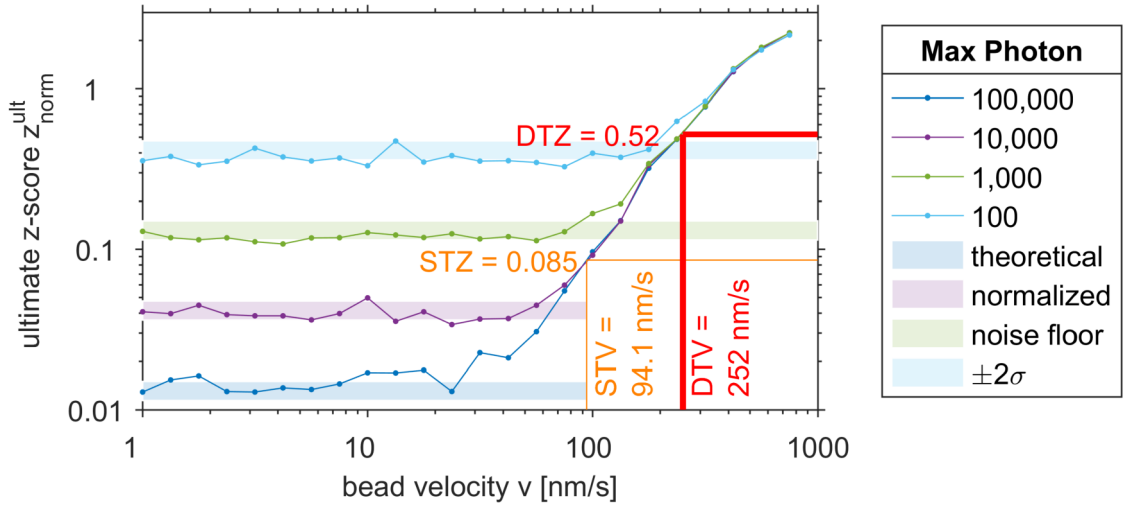


Abbildung 7.1: Ultimate normalisierter z-score eines Beads in Abhängigkeit seiner Geschwindigkeit und der Anzahl der Photonen (zum Vergleich s. Abb. 5.18) Durch die Normalisierung ist das Signal für die relevanten hohen Geschwindigkeiten photonenunabhängig, solange eine Mindestanzahl Photonen erreicht ist. Die Umrechnung von maximal zulässiger Geschwindigkeit (STV und DTV) in z-scores (STZ und DTZ) ist damit möglich.

lized z-score“- STZ. Analog wird der DTV umgerechnet in den „Distortion-Threshold normalized z-score“- DTZ. Wie in Abb. 7.1 dargestellt ergibt sich

$$STZ = 0,085 \quad (7.3)$$

$$DTZ = 0,52 \quad (7.4)$$

7.3. Notwendiges Signal-Rausch-Verhältnis

Aufgrund des (photonenabhängigen) Hintergrundrauschens ist nun eine Mindestanzahl an Photonen N_{min}^{STZ} bzw. N_{min}^{DTZ} notwendig, sodass sich das Signal z_{norm}^{ult} vom Hintergrundrauschen n_{floor}^{ult} abheben kann. Unter Beachtung der schätzungsweise 60 Millionen untersuchten Pixeln in den Pseudo Weitfeld Bildern ($[x; y; z; \text{Richtungen}] = [1000; 1000; 20; 3] = 60 \text{ Millionen}$) ist ein SNR von 5,64 angebracht (s. Tab. 2). Dies ist - nach der Gaußschen Fehlerfunktion - äquivalent zu einer falsch-positiven Entscheidung in allen Pixeln. Dies ist vertretbar und ein gutes Maß:

$$\frac{1}{1 - \text{erf}\left(\frac{\text{SNR}}{\sqrt{2}}\right)} = 60 \cdot 10^6 \curvearrow \text{SNR} = 5,64 \quad (7.5)$$

Anhand der Definition des SNR ergibt sich der photonenabhängige Mindestwert des Signales, welcher im Folgenden mit $z_{norm}^{5,64}$ bezeichnet wird, zu:

$$Gl. 2.31 : SNR := \frac{\text{Wert} - \text{Offset}}{\text{Standardabweichung}} \quad (7.6)$$

angewandt auf das hiesige Problem:

$$5,64 \stackrel{Gl. 7.5}{=} SNR = \frac{z_{norm}^{ult} - n_{floor}^{ult}(N)}{\sigma(n_{floor}^{ult}(N))} \stackrel{Gl. 7.2}{\approx} \frac{z_{norm}^{ult} - \frac{4,2}{\sqrt{N}}}{\frac{0,3}{\sqrt{N}}} \quad (7.7)$$

$$z_{norm}^{ult} = \frac{5,892}{\sqrt{N}} = z_{norm}^{5,64}(N) \quad (7.8)$$

Damit ergibt sich insbesondere für die beiden Schwellwerte ($STZ = 0,085 = z_{norm}^{5,64}(N_{min}^{STZ})$ und $DTZ = 0,52 = z_{floor}^{ult}(N_{min}^{DTZ})$) die Mindestanzahl an Photonen zu:

$$N_{min}^{STZ} \approx 4800 \quad (7.9)$$

$$N_{min}^{DTZ} \approx 128 \quad (7.10)$$

7.4. Klassifizierung der Artefakte

Nur wenn der Wert z_{norm}^{ult} eines Pixels größer als $z_{norm}^{5,64}(N)$ ist, so ist die Anzahl an Photonen hoch genug, sodass die Zuordnung von z_{norm}^{ult} zur Geschwindigkeit v und damit zu einem bestimmten Artefakt erfolgen kann. Tabelle 4 (s. A.9) zeigt das Signal-Rausch-Verhältnis von z_{norm}^{ult} in Abhängigkeit von der Anzahl der Photonen.

Die finale Klassifizierung eines jeden Pixels der SIM-Aufnahme in die 4 Kategorie: **Stationär**, **Scherung**, **Verformung** und **Rauschen** erfolgt Anhand der Photonenzahl N und des normalisierten z-scores z_{norm} . Die Verwendung von insgesamt 5 Schwellwerten: N_{min}^{STZ} , N_{min}^{DTZ} , STZ, DTZ und $z_{norm}^{5,64}(N)$ ist sehr komplex aber notwendig. Abbildung 7.2 visualisiert die Zusammenhänge in der Klassifizierung.

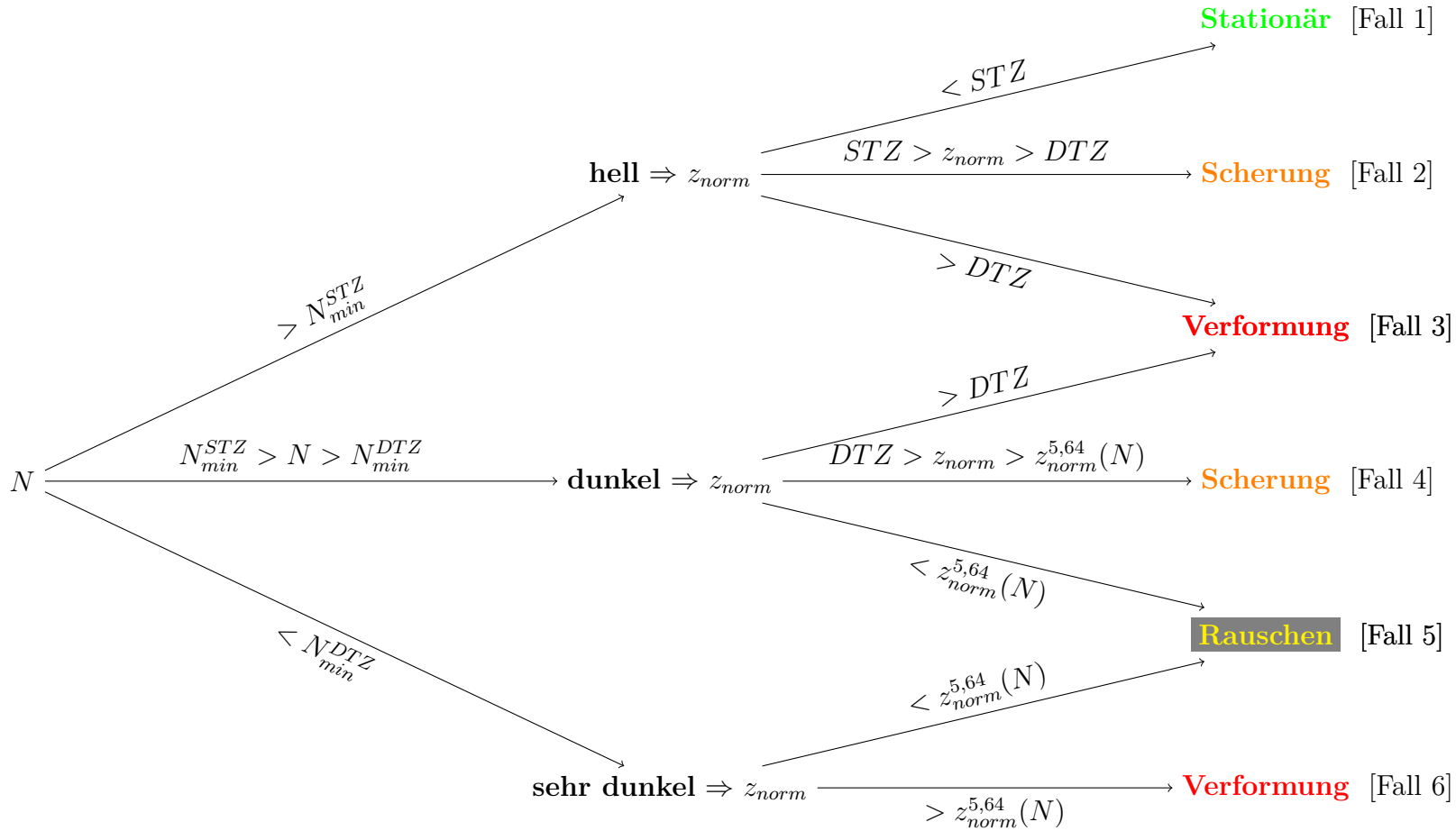


Abbildung 7.2: Klassifizierung der Bewegung eines Pixels Anhand der dortigen Photonenzahl N und des normalisierten z-scores z_{norm} . Aus dieser Klassifikation entsteht die Falschfarbengrafik in Abb. 7.3

Die Anzahl der Photonen klassifiziert den Pixel als „hell“, „dunkel“ oder „sehr dunkel“. Die Anzahl der Photonen in hellen Pixeln liegt über N_{min}^{STZ} , sodass das SNR des normalisierten z-score hoch genug ist um die Schwellwertbildung für Scherung (STZ) und Verformung (DTZ) mit hoher Konfidenz anzuwenden (dunkelblau und violette Kurve in Abb. 7.1). Liegt z_{norm} unter der STZ so ist das Bild in jenem Pixel stationär [Fall 1]. Überschreitet z_{norm} die DTZ, so liegt ein Artefakt in Form einer Verformung vor [Fall 3]. Andernfalls wird es als Scherung definiert [Fall 2].

Unterschreitet ein Pixel die Mindestanzahl N_{min}^{STZ} , so handelt es sich um eine dunkle Struktur und das SNR des Hintergrunds muss berücksichtigt werden (grüne Kurve in Abb. 7.1). Eine Klassifizierung kann nur erfolgen, wenn der normalisierte z-score deutlich höher als der Hintergrund ist. Dies wird durch den diskutierten (Mindest-)/Wert von $z_{norm}^{5,64}(N)$ sichergestellt. Die Schwellwertbildung an der STZ kann dann nicht mehr erfolgen, da die STZ stets kleiner als der Mindestwert ist. Daher ist eine Klassifizierung als stationäres Objekt nicht mehr möglich. Wird der Mindestwert unterschritten, so kann der Pixel nur als Rauschen klassifiziert werden, selbst wenn der normalisierte z-score noch so klein ist [Fall 5]. Daraus folgt insbesondere, dass ein Objekt die Mindesthelligkeit von $N_{min}^{STZ} = 4800$ Photonen haben muss, um als artefaktfrei klassifiziert werden zu können. Dies stellt eine hohe experimentelle Hürde dar, da so viele Photonen nicht immer erzeugt werden können, ohne phototoxische Schäden der Probe zu generieren. Wird der Wert von $z_{norm}^{5,64}(N)$ aber überschritten, so kann eine Scherung festgestellt werden [Fall 4]. Auch hier gehen Artefakte im Rauschen verloren. Trotzdem werden nur die leichten Scherungen, mit kleinerem z-score, verloren. Die Detektion von Verformungen als Artefakte ist immer noch vollständig möglich, solange die Mindestanzahl an Photonen für diese Schwelle ($N_{min}^{DTZ} = 128$ (s.Gl. 7.10)) eingehalten wird [Fall 3].

Erst wenn auch diese Anzahl an Photonen nicht mehr detektiert wird, so fällt die Schwelle der DTZ (hellblaue Kurve in Abb. 7.1). Auch hier muss dann der Mindestwert von $z_{norm}^{5,64}(N)$ zur Schwellwertbildung verwendet werden. Da dieser für wenige Photonen sehr rasch ansteigt (s. Gl. 7.8), wird bei wenigen Photonen zumeist Rauschen klassifiziert [Fall 5]. Nur sehr schnelle Bewegungen, lassen den normalisierten z-score vom hohen Hintergrund abheben, sodass eine Verformung detektiert und klassifiziert werden kann [Fall 6].

Das Schema aus Abb. 7.2 kann auch als Falschfarbenkarte in einer alternativen Form visualisiert werden (s. Abb. 7.3). Um die Klassifizierung von 3D Daten auf einen Blick zu ermöglichen ist eine Projektion entlang z sinnvoll. Es ist wünschenswert, dass ein Artefakt angezeigt wird, selbst wenn es nicht in allen Schichten vorhanden ist. Daher

kann eine Maximumsprojektion des z-scores entlang z vor der Klassifizierung durchgeführt werden. Solche Bilder sind im Folgenden stets mit „Projektion“ gekennzeichnet.

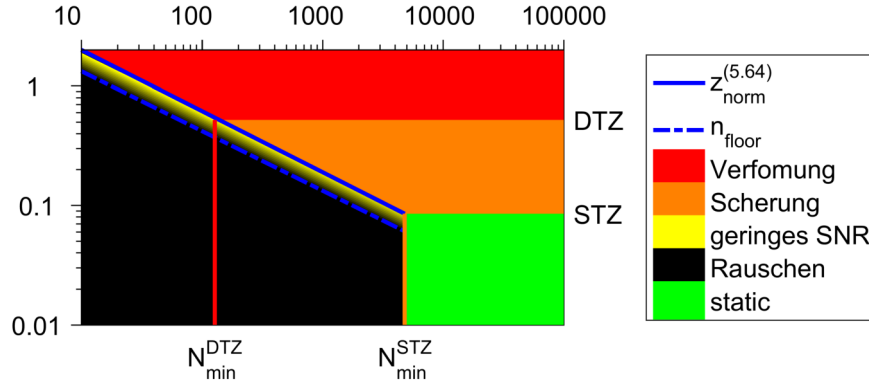


Abbildung 7.3: Alternative Ansicht zu Abb. 7.2: Die Bewegungsgeschwindigkeit - und damit die Klassifizierung - hängt vom normalisierten z-score und der Photonenzahl ab. Der normalisierte z-score entscheidet über die Klassifizierung als Artefakt (DTZ (Distortion-Threshold normalized z-score) und STZ (Shearing-Threshold normalized z-score)), während die Anzahl an Photonen über die Sicherheit dieser Klassifizierung entscheidet (N_{min}^{DTZ} und N_{min}^{STZ}). Um ein Objekt als stationär verifizieren zu können muss es mindestens N_{min}^{STZ} Photonen haben.

7.5. Übertragung der Schwellwerte auf andere Aufnahmeparameter

Die vorangegangenen Simulationen verwendeten die in Abschnitt 5.4 dargestellten Parameter aus dem fastSIM-setup [RF2] und [RF3]. Die Parameter können sich jedoch ändern. Insbesondere die Belichtungszeit muss an die Probe und die verwendeten Fluorophore angepasst werden. Die vorangegangenen Simulationen und Berechnung der DTV wurde für verschiedene Belichtungszeiten wiederholt. Abbildung 7.4 zeigt, dass die DTV sinkt, wenn die Belichtungszeit steigt. Kann man die Geschwindigkeit eines Teilchens, zum Beispiel durch klassische Weitfeld Aufnahmen, abschätzen, so kann man die maximal zulässige Belichtungszeit für SIM ablesen. Dadurch kann vermieden werden, dass vom Objekt zwar helle Rohbilder gemacht werden können, die Rekonstruktion dann aber nur Bewegungsartefakte an den entscheidenden Stellen zeigt. Dieses Vorwissen ist insbesondere bei der Präparation von lebendigen und kostbaren Proben wertvoll.

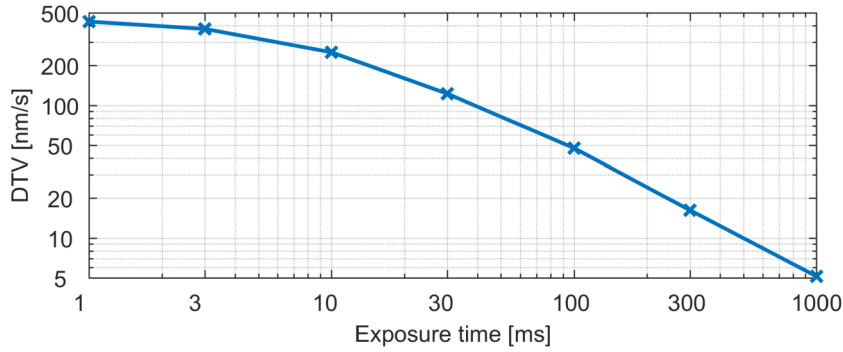


Abbildung 7.4: Schwellwert DTV (Distortion-Threshold-Velocity) in Abhängigkeit der Belichtungszeit. Je kürzer Belichtet wird, desto schnellere Bewegungen können artefaktfrei abgebildet werden.

Abbildung 7.5 zeigt z_{norm}^{ult} in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Hierbei wurden Belichtungszeiten über 3 Größenordnungen simuliert, sodass alle relevanten Zeiträume abgedeckt werden. Die Geschwindigkeit ist auf die DTV der jeweiligen Belichtungszeit normiert. Der sich daraus ergebende Schwellwert DTZ ist unabhängig von der Belichtungszeit und kann daher global angewandt werden. Begründet wird dies damit, dass sowohl das Artefakt als auch der z-score einer Struktur nur von der zurückgelegten Strecke \vec{d} und nicht von der Geschwindigkeit selbst abhängt (s. Gl. 5.2).

Analog ist auch die STZ nicht von der Belichtungszeit abhängig, da auch sie lediglich von der zurückgelegten Strecke und nicht der Geschwindigkeit selbst abhängt.

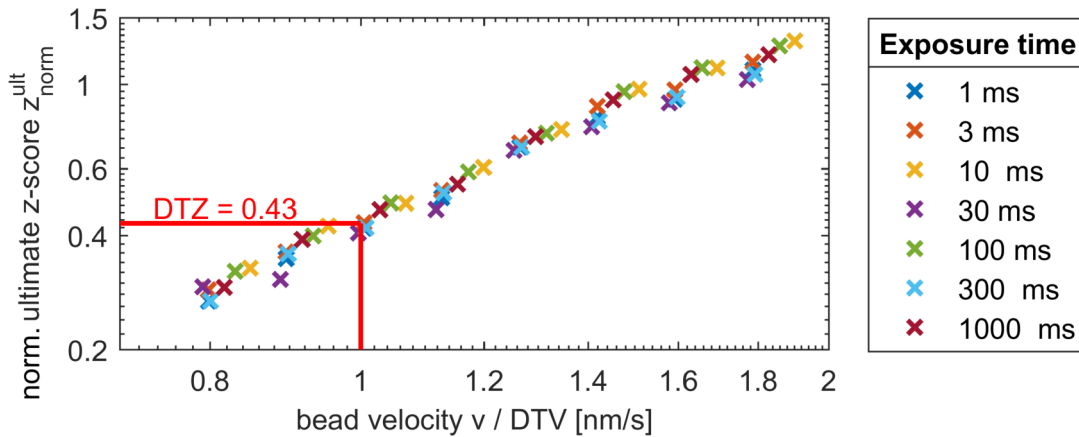


Abbildung 7.5: Ultimate normalisierter z-score eines Beads in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit (normalisiert auf die jeweilige DTV (Distortion-Threshold-Velocity)) und Belichtungszeit. Die Schwellwertbildung zur Klassifizierung von Artefakten (DTZ (Distortion-Threshold normalized z-score)) ist unabhängig von der Belichtungszeit.

8. Klassifizierung von Artefakten an lebenden Zellen

Die in Abschnitt 5.2 auf ihre Bewegungsartefakte untersuchten Proben können mit dem normalisierten z-score erneut ausgewertet werden. Die Bildverarbeitung ist dabei - bis auf den normalisierten z-score - analog zur vorherigen Auswertung. Eine Maximum Projektion entlang z wurde durchgeführt um Bewegungen im 3D-SIM-Bild in einem einzigen Bild (der Motionmap) darstellen zu können.

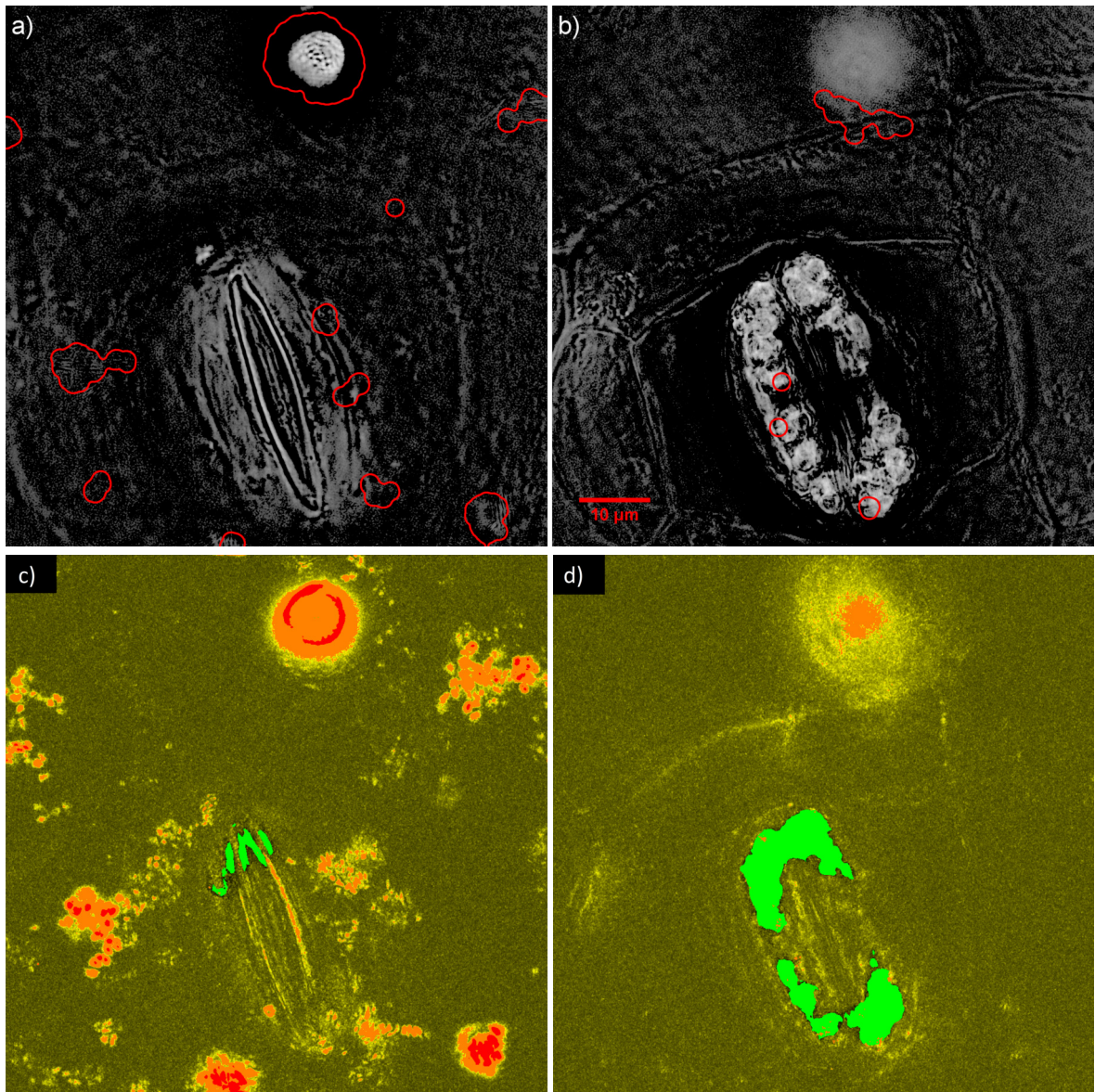


Abbildung 8.1: Vergleich: Bewegungsdetektion durch z-score (a und b; Bewegung ist rot markiert) und Klassifizierung von Bewegungsartefakten durch den normalisierten z-score (c und d) an lebenden Zellen. In Fokus sind hierbei das freie Chloroplast (a und c) bzw. die fixierte Spaltzelle (b und d). (grün = Stationär; schwarz bis gelb = Rauschen; orange = Scherung; rot = Verformung)

Der Unterschied zwischen der Verwendung von z-score (nochmals in Abb. 8.1 oben dargestellt; Bewegung ist rot markiert) und normalisierten z-score (Abb. 8.1 unten) ist groß. Gemeinsam haben sie nur, dass das freie Chloroplast und die frei beweglichen Fluorophore als Bewegungsartefakt detektiert werden. Zudem gilt die Abbildung der Spaltzelle als artefaktfrei. Die Unterschiede sind im Detail:

1. Die empirische Schwellwertbildung (oben) des Bewegungssignals detektiert nur *Bewegung*. Während die aufwendigere Schwellwertbildung des normalisierten z-scores (unten), aufbauend auf theoretischen Untersuchungen, die entstehenden *Artefakte* detektiert und klassifiziert.
2. Die Klassifizierung ermöglicht es zwischen Scherung und Verformung zu unterscheiden.
3. Die Helligkeit der Objekte entscheidet nicht über deren Klassifizierung.
 - a) Sehr helle Strukturen werden nicht automatisch als Bewegungsartefakt aufgefasst. Dies ist insbesondere am freien Chloroplasten (links unten in Abb. 8.1) sichtbar. Das freie Chloroplast zeigt wenige Bereiche mit einer Verformung (rot). Der Großteil des Chloroplasts ist lediglich als eine Scherung (orange) klassifiziert. Dies deckt sich sehr gut mit den Beobachtungen in 5.2.2. Der Chloroplast wird in jeder Schicht gut abgebildet (s. Abb. 5.11). Es sind lediglich die Schichten, welche zueinander versetzt sind (s. Abb. 5.10). Die Methode des z-scores detektiert erfolgreich die Bewegung des Chloroplasts. Diese dadurch aber als Artefakt zu markieren ist nur bedingt richtig. Die Abbildung des Chloroplasts kann - unter dem Wissen der vorhandenen Scherung - verwendet werden.
 - b) Im Gegenzug werden sehr dunkle Strukturen nicht automatisch als artefaktfrei klassifiziert. Dies zeigt sich insbesondere daran, dass die Bewegung der Fluorophore zwar detektiert wird (oben links), der Bereich in denen sie Artefakte bilden aber relativ klein ist. Der normalisierte z-score klassifiziert einen erheblich größeren Bereich um die Fluorophore herum als Artefakt. Dies passt erneut zur Analyse der einzelnen Fluorophore, deren Abbildung erhebliche Verformungen beinhaltet (s. Abb. 5.12).

Alternative Visualisierung Eine Alternative Visualisierung ist es, ausschließlich die Klassen der Bewegungsartefakte (*Artefactmap* - s. Abb. 8.2 links und Abb. A.4) bzw. die Klassen der stationären Anteile und Rauschen (*Trustmap* - s. Abb. A.3 und Abb. 8.2 rechts) anzuzeigen.

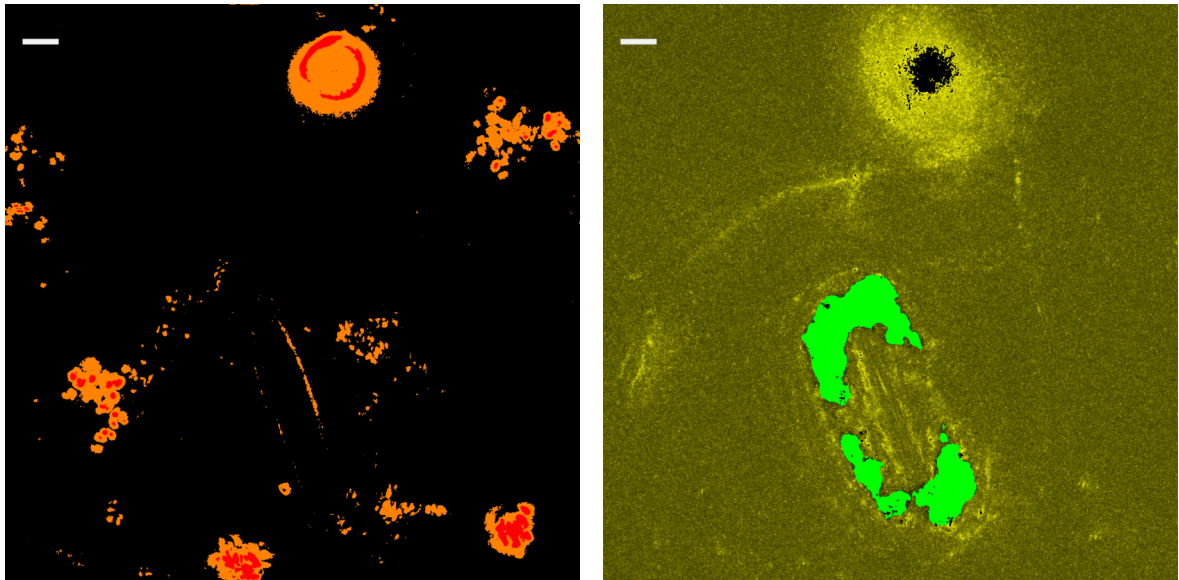


Abbildung 8.2: *Beispiel einer alternativen Visualisierung der Klassifizierung. links: Artefactmap des freien Chloroplasts; rechts: Trustmap der fixierten Spaltzelle. (Balken oben links = 5 μ m; grün = Stationär; schwarz bis gelb = Rauschen; orange = Scherung; rot = Verformung)*

9. Diskussion

Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) steht oft in der Kritik, da die notwendige Bildrekonstruktion unvorhersehbare Bewegungsartefakte erzeugen kann, welche nicht von real existierender Hochauflösung zu trennen sind. Die Detektion, Lokalisation und Bewertung von Artefakten in Mikroskopen mit höchster Auflösung ist von großer Bedeutung, um sicherzustellen, dass die aufgenommenen Bilder das Objekt wahrheitsgemäß wiedergeben. Der hier vorgestellte Algorithmus erfüllt diese Aufgabe. Hierbei ist es als erstes notwendig, eine Bewegung der Probe sichtbar zu machen. Aufgrund des sich von Bild zu Bild ändernden Beleuchtungsmusters, können Standardverfahren, wie die Frame Difference Method nicht ohne weiteres angewandt werden. Eine Vorprozessierung ist daher notwendig, sodass mehrere Rohbilder jeweils zu einem Bild mit homogener und gleichbleibender Beleuchtung zusammengesetzt werden können. Hierfür ist für 2D-SIM ein zusätzliches Rohbild notwendig. Dies erhöht die Aufnahmedauer jedoch nur unwesentlich und führt darüber hinaus auch zu keiner zusätzlichen phototoxischen Belastung der Probe. Die Bewegungsdetektion wurde erfolgreich sowohl an Beads, als auch einer BPAE-Zelle, demonstriert. Die Detektion von Bewegung in 3D-SIM kommt sogar ohne die Aufnahme zusätzlicher Bilder aus. Daher ist der hier vorgestellte Algorithmus für beide SIM-Modi minimalinvasiv. Für 3D-SIM ist es sogar möglich, bereits veröffentlichte und angezweifelte Datensätze nachträglich auf Artefakte zu untersuchen und die Kritik mit quantitativen Beweisen zu widerlegen bzw. zu beweisen. Um die unbekannte Bewegung von auf Rauschen beruhenden Fluktuationen zu trennen, muss das Rauschen bestmöglich bekannt sein. Die hier dargestellte Abschätzung des Rauschens in den Rohbildern und dessen Fehlerfortpflanzung durch die Bildverarbeitung ist vollständig und als präzise anzusehen.

Die Möglichkeit der Bewegungsdetektion wurde hierbei an einer biologischen Probe erstmals nachgewiesen. Die Drehung eines freien Chloroplasts während der Aufnahme konnte mühsam per Hand identifiziert werden. Der Algorithmus detektiert diese Bewegung erfolgreich und vollautomatisch (richtig positiv). Die Aufnahme einer fixierten Probe führt zu keinem Bewegungssignal (richtig, negativ).

Nicht jeder von Null verschiedene Wert der Frame Difference Method ist auf Bewegung zurückzuführen. Zudem führt auch nicht jede Bewegung zu einem Bewegungsartefakt. Und insbesondere ist nicht jedes Bewegungsartefakt so gravierend, als das die Abbildungen des Objektes als wahrheitswidrig anzusehen ist.

Daher ist es von fundamentaler Bedeutung, Artefakte in akzeptable und inakzeptable unterscheiden zu können. Das Auflösungskriterium nach Sparrow wurde hierbei als die Grenze definiert. Zwei Punkte im Abstand des Sparrow-Limit als lediglich einen

Punkt in deren Mitte zu interpretieren, ist das „gravierendste“ Bildartefakt, welches gerade noch als akzeptabel gilt. Diese Herangehensweise erscheint durchaus diskussionswürdig. Aufgrund des Mangels an theoretischen Grundlagen zu diesem Thema ist es trotzdem ein sehr guter erster Ansatz, dass maximal erlaubte und akzeptierte Artefakt zu definieren. Ein zukünftiger Diskurs über diese Thematik ermöglicht vielleicht eine bessere Lösung. Die Simulation einer SIM-Aufnahme von bewegten Beads zeigt schlüssig, die Zunahme von Bewegungsartefakten mit der Geschwindigkeit. Mithilfe einer Referenzabbildung durch einen stationären Bead und der leistungsstarken Operation der Kreuzkorrelation, kann das Artefakt eines jeden Beads bei beliebiger Geschwindigkeit einen quantitativen Wert - die Similarity - zugewiesen werden. Dies ermöglicht die Untersuchung des Zusammenhangs von Geschwindigkeit und entstehendem Artefakt. Die definierte Grenze zwischen akzeptablen und inakzeptablen Artefakten am Sparrow-Limit ermöglicht das festsetzen einer maximalen erlaubten Geschwindigkeit und normalisierten z-score. Durch die theoretische Untersuchung des Einflusses der Helligkeit auf die Frame Difference Method, konnte durch Einführung des normalisierten z-scores ein Bewegungssignal gefunden, welches - insofern das Objekt hell genug ist - ausschließlich von der Geschwindigkeit des Objektes abhängt. Die Abhängigkeit von der Helligkeit wurde aufgehoben. Damit wird die Brücke gebaut zwischen der experimentell messbaren Größe des normalisierten z-scores und dem theoretisch begründeten maximal erlaubten Artefakt.

Der präsentierte Algorithmus ermöglicht die Klassifizierung der Probe. Die Aufnahme der fixierten Spaltzelle wurde erfolgreich als stationär klassifiziert. Hintergrund und Strukturen ohne signifikante Helligkeit wurden als Rauschen klassifiziert. Der Algorithmus ist demnach robust und in der Lage stationäre und dunkle Objekte - welche keine (sichtbaren) Bewegungsarte im Bild erzeugen - auch als solche zu erkennen. Die Drehung des Chloroplasts wurde lokal als Scherung entdeckt und klassifiziert. Die SIM-Aufnahmen können demnach innerhalb einer Fokusschicht als richtig angesehen werden. Für eine 3-dimensionale Analyse der Daten ist Vorsicht geboten, da die Objekte zwischen den Fokusschichten ihre Position ändern. Eine vollautomatische korrekte Weiterverarbeitung der Bilder in 3D - insbesondere in der Bioinformatik - ist ausgeschlossen. Einzelne Fluorophore mit erheblichen Verformungen wurden auch als solche klassifiziert. Der Algorithmus ist demnach in der Lage Bewegungsartefakte in 4 Kategorien erfolgreich zu unterteilen.

Das Anzeigen von Bewegungsartefakten gibt Wissenschaftler die Möglichkeit die Aufnahmeparameter zu optimieren. Werden Bewegungsartefakte angezeigt, so führt beispielsweise ein anderer Bildausschnitt (ohne phototoxische Schäden durch die erste

Aufnahme) mit höherer Laserintensität und geringerer Belichtungszeit zu einem artefaktfreien Bild. Zudem ist es allgemein möglich zu entscheiden, ob ein zu untersuchender biologischer Prozess überhaupt mit SIM artefaktfrei abgebildet werden kann. Viele Wissenschaftler die SIM benutzen sind sich dem Vorhandensein von Bewegungsartefakte nicht bewusst. Der hier dargestellte Algorithmus kann für diese Thematik zum einen sensibilisieren. Zum anderen kann dem Wissenschaftler aber auch die Suche nach Artefakten abgenommen werden. Die standardmäßige Überprüfung von SIM-Bildern auf Bewegungsartefakte ist möglich.

Die erfolgreiche Entwicklung eines Algorithmus zur Detektion von Bewegung in Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung, sowie der grundlegenden theoretischen Definition des maximal zulässigen Artefaktes im Bild und die gelungene vollautomatische Klassifizierung von Bewegungsartefakten an lebenden Zellen ist ein fundamentaler Fortschritt für den Nachweis der Gute wissenschaftlichen Praxis in biomedizinischer Forschung.

A. Wissenschaftlicher Anhang

A.1. Diffusion aus dem Bereich der Punktspreizfunktion

Die Zeit τ die ein Partikel durchschnittlich benötigt, um sich durch Diffusion allein von seinem Ausgangsort um mindestens die Distanz x zu entfernen, berechnet sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung. Dies benötigt den tabellierten Diffusionskoeffizienten D und entspringt dem Fickschen Gesetz[2, 30, 37, 70]:

$$\tau = \frac{x^2}{6D} \quad (\text{A.1})$$

Damit sich ein Fluorophor um mindestens die Halbwertsbreite der SIM-PSF ($\text{FWHM}_{\text{SIM}} \approx 100 \text{ nm}$ [RF2]) bewegt, und damit in der Abbildung verschwimmt, benötigt es durchschnittlich die Zeit τ_{FWHM} . Die Belichtungszeit der Abbildung sollte diese Zeit nicht überschreiten.

$$\tau_{\text{FWHM}} = \frac{\text{FWHM}_{\text{SIM}}^2}{6D} \quad (\text{A.2})$$

A.2. Fouriertransformation

Definition

Durch die Fouriertransformation (gekennzeichnet durch den Operator \mathcal{F}) einer Funktion $f(x)$, kann diese als Summe von (unendlichen vielen) Frequenzen k eindeutig dargestellt werden^[26] [50]:

$$\tilde{f}(k) = \mathcal{F}(f(x))(k) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) \cdot e^{ikx} dx \quad (\text{A.3})$$

$$f(x) = \mathcal{F}^{-1}(\tilde{f}(k))(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{f}(k) \cdot e^{-ikx} dk \quad (\text{A.4})$$

Die Fouriertransformierte $\tilde{f}(k)$ ist komplexwertig und besitzt demnach eine Amplitude und eine Phase für jede Kreisfrequenz k .

Die optische Interpretation der Fouriertransformation ist, dass jede beliebige Intensitätsverteilung in eine Summe ebener Wellen zerlegt werden kann. Die Kreisfrequenz k ist die Wellenzahl und definiert durch $k = \frac{2\pi}{\lambda}$.

²⁶Der skalare Faktor der Fourier-Transformation $\frac{1}{\sqrt{2\pi}}$ wird der Anschaulichkeit halber ausgelassen.

Eigenschaften

Addition und Linearität:

$$\mathcal{F}\{a \cdot f(x) + b \cdot g(x)\} = a \cdot \tilde{f}(k) + b \cdot \tilde{g}(k) \quad (\text{A.5})$$

Verschiebungssatz:

$$\mathcal{F}\{f(x - \delta)\} = \tilde{f}(k) \cdot e^{-ik\delta} \quad (\text{A.6})$$

Komplexe Konjugation:

$$\mathcal{F}\{f^*(x)\} = \tilde{f}^*(-k) \quad (\text{A.7})$$

$$\curvearrowright f(x) \in \Re \rightarrow \tilde{f}(k) = \tilde{f}^*(-k) \quad (\text{A.8})$$

Definition Faltungsoperator (\otimes):

$$[f \otimes g](x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x') \cdot g(x - x') dx' \quad (\text{A.9})$$

Faltungstheorem:

$$\mathcal{F}\{f(x) \otimes g(x)\} = \mathcal{F}\{f(x)\} \cdot \mathcal{F}\{g(x)\} = \tilde{f}(k) \cdot \tilde{g}(k) \quad (\text{A.10})$$

Komplexe Konjugation einer Faltung:

$$[(f \otimes g)(r)]^* = [f^* \otimes g^*](r) \quad (\text{A.11})$$

Definition Kreuzkorrelation (\star):

$$[f \star g](x) = [f^*(-x') \otimes g(x')](x) = \int_{-\infty}^{\infty} f^*(x') \cdot g(x + x') dx' \quad (\text{A.12})$$

Fehlerfortpflanzung bei einer Faltung mit Kernel K :

$$\begin{aligned}
 \sigma^2 [[f \otimes K](x)] &= \sigma^2 \left[\int_{-\infty}^{\infty} f^*(x') \cdot K(x+x') dx' \right] \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} \sigma^2 [f^*(x') \cdot K(x+x')] dx' \\
 &= \int_{-\infty}^{\infty} \sigma^2 [f^*(x')] \cdot K^2(x+x') dx' \\
 \sigma^2 [[f \otimes K](x)] &= [\sigma^2 [f] \otimes K^2](x)
 \end{aligned} \tag{A.13}$$

A.3. Abbe-Limit

Das Abbe-Limit ist die kleinste periodische Gitterstruktur, welche durch eine Linse oder ein optisches System übertragen werden kann. Dafür wird das fluoreszente Objekt als Überlagerung ebener Welle verstanden (Fourier Transformation). Damit einer Welle übertragen werden kann, muss es durch die Eingangsblende \tilde{p} der Linse oder des optisches System gelangen. Hierfür ist es notwendig, dass der Winkel der ebene Welle zur optischen Achse β kleiner ist als der Öffnungswinkel der Linse α . Ausgehend von Gleichung 2.5 und Abbildung 2.2 gilt für die ATF:

$$\tan \beta = \frac{k_{lat}}{k_z} = \frac{k_{lat}}{\sqrt{k^2 - k_{lat}^2}} = \frac{1}{\sqrt{\frac{k^2}{k_{lat}^2} - 1}} \tag{A.14}$$

Der maximal mögliche Winkel einer Welle zur optischen Achse ist damit bestimmt durch:

$$\tan \alpha = \tan \beta_{max} \tag{A.15}$$

Laterales Abbe-Limit

Der maximal übertragene laterale Frequenz $k_{lat_{max}}$ ist folglich:

$$\begin{aligned}
 \tan \alpha &= \frac{1}{\sqrt{\frac{k^2}{k_{lat_{max}}^2} - 1}} \\
 k_{lat_{max}}^2 &= \frac{k^2}{1 + \frac{1}{\tan^2 \alpha}} = k^2 \cdot \sin^2 \alpha \\
 k_{lat_{max}} &= k \cdot \sin \alpha = \frac{2\pi}{\frac{\lambda}{n}} \cdot \sin \alpha = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \text{NA}
 \end{aligned} \tag{A.16}$$

Anhand der Geometrie der Operation in Gleichung 2.18 ergibt sich die maximal Übertragbare Frequenz der OTF - die Abbefrequenz f_{Abbe} .

$$f_{Abbe} = \frac{2 \cdot k_{lat_{max}}}{2\pi} = \frac{2NA}{\lambda} \quad (A.17)$$

Umgerechnet in die kleinste übertragene Gitterperiode - das Abbe-Limit $d_{Abbe_{lat}}$:

$$d_{Abbe_{lat}} = \frac{1}{f_{Abbe}} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (A.18)$$

Axiales Abbe-Limit

Der maximal übertragene axiale Frequenz $k_{ax_{max}}$ ist:

$$\begin{aligned} k_{ax_{max}} + k_{ax_{offset}} &= k = k_{ax_{max}} + \sqrt{k^2 - k_{lat_{max}}^2} \\ k_{ax_{max}} &= k - \sqrt{k^2 - k_{lat_{max}}^2} = k \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{k_{lat_{max}}}{k} \right)^2} \right) \\ k_{ax_{max}} &= \frac{2\pi}{\frac{\lambda}{n}} \left(1 - \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n} \right)^2} \right) \\ k_{ax_{max}} &= \frac{2\pi}{\lambda} \left(n - \sqrt{n^2 - NA^2} \right) \end{aligned} \quad (A.19)$$

Damit ist die kleinste axial übertragbare Gitterperiode - das axiales Abbe-Limit $d_{Abbe_{ax}}$:

$$d_{Abbe_{ax}} = \frac{2\pi}{k_{ax_{max}}} = \frac{\lambda}{\left(n - \sqrt{n^2 - NA^2} \right)} \quad (A.20)$$

A.4. Gitterperiode und Phasen in 3D-SIM

n	a	a'	$\left[\vec{k}_a - \vec{k}_b\right]_{lat}$	$\left[\vec{k}_a - \vec{k}_b\right]_{ax}$	$\phi_n = \phi_a - \phi_b - \phi_0$
-2	-1	+1	$-2 \vec{k} \sin \alpha = -2k_g$	0	$-2m\phi_{schritt}$
-1d } -1u } -1	0 -1	+1 0	$-k_g$ $-k_g$	$- \vec{k} \cos \alpha = -k_{as}$ $+k_{as}$	$-m\phi_{schritt}$ $-m\phi_{schritt}$ \hookrightarrow nicht separierbar
0 0 0	-1 0 +1	-1 0 +1	0	0	0
+1u } +1d } 1	0 +1	-1 0	k_g k_g	$+k_{as}$ $-k_{as}$	$m\phi_{schritt}$ $m\phi_{schritt}$ \hookrightarrow nicht separierbar
+2	+1	-1	$2k_g$	0	$2m\phi_{schritt}$

Tabelle 3: Übersicht der Interferenz von 3 Strahlen ($a \in \{-1, 0, +1\}$) aus Abb. 3.2 und Gl. 3.4. Die hohe Symmetrie der Strahlen (Strahl 0 auf optischer Achse; $\phi_1 = -\phi_{-1}$ und $\phi_0 = 0$) führt zu einer hohen Symmetrie im Interferenzmuster. Die beiden Subordnungen in den beiden ersten Ordnungen (d-down und u-up) haben stets die gleiche Phase und sind deshalb nicht separierbar. Daher muss die Separation schon bei der Aufnahme selbst geschehen (s. Abschnitt 3.2.2).

A.5. Alternative Darstellung der SIM-Ordnungen und SIM Detektions-OTF

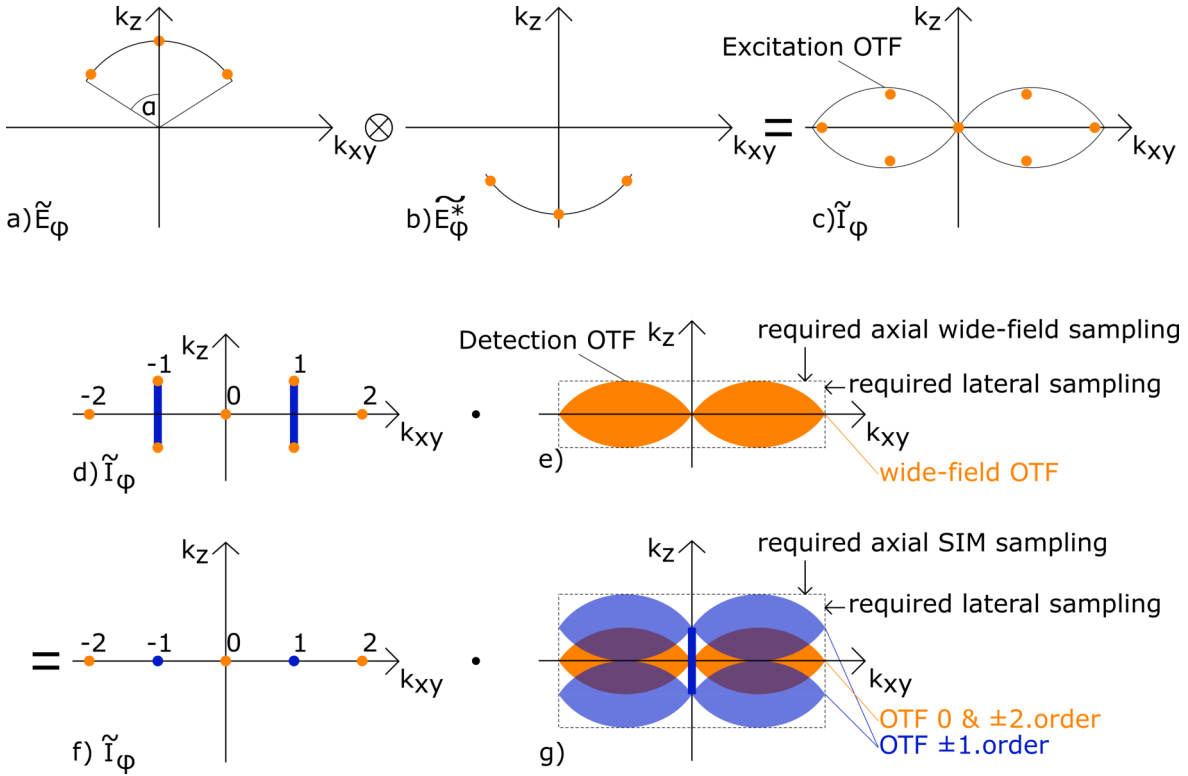


Abbildung A.1: Die drei Beleuchtungssps \tilde{E}_ϕ in 3D-SIM in der hinteren Fokalebene des Objektivs (a) interferieren im Fokus des Objektivs. Diese Interferenz kann als Faltung der Beleuchtungssps mit deren eigener komplex konjugierten \tilde{E}_ϕ^* (b) geschrieben werden. Hierdurch können die 7 SIM-Ordnungen konstruiert werden (c). Insgesamt 4 SIM-Ordnungen sind jeweils paarweise gekoppelt. Das heißt, dass ihre Phase, welche zur Separation notwendig ist, stets identisch ist (s. Tab. 3) (d). Die gekoppelten Ordnungen haben dabei aus Symmetriegründen die gleiche laterale Verschiebung und unterscheiden sich lediglich in ihrem axialen Anteil. Die unmögliche Separation gekoppelter Ordnungen wird daher überflüssig, wenn die unterschiedliche axiale Verschiebung in der Rekonstruktion schon durch die Detektions-OTF während der Aufnahme übernommen wird (g). Durch die axial verschobene Detektions-OTF ist ein feineres laterales Abtasten notwendig. Es verbleiben 5 SIM-Ordnungen mit verschiedener lateraler Verschiebung, sodass 5 Rohbilder aufgenommen werden müssen um diese erfolgreich zu rekonstruieren (g). Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

A.6. Schematische Darstellung der SIM Aufnahmeprozedur

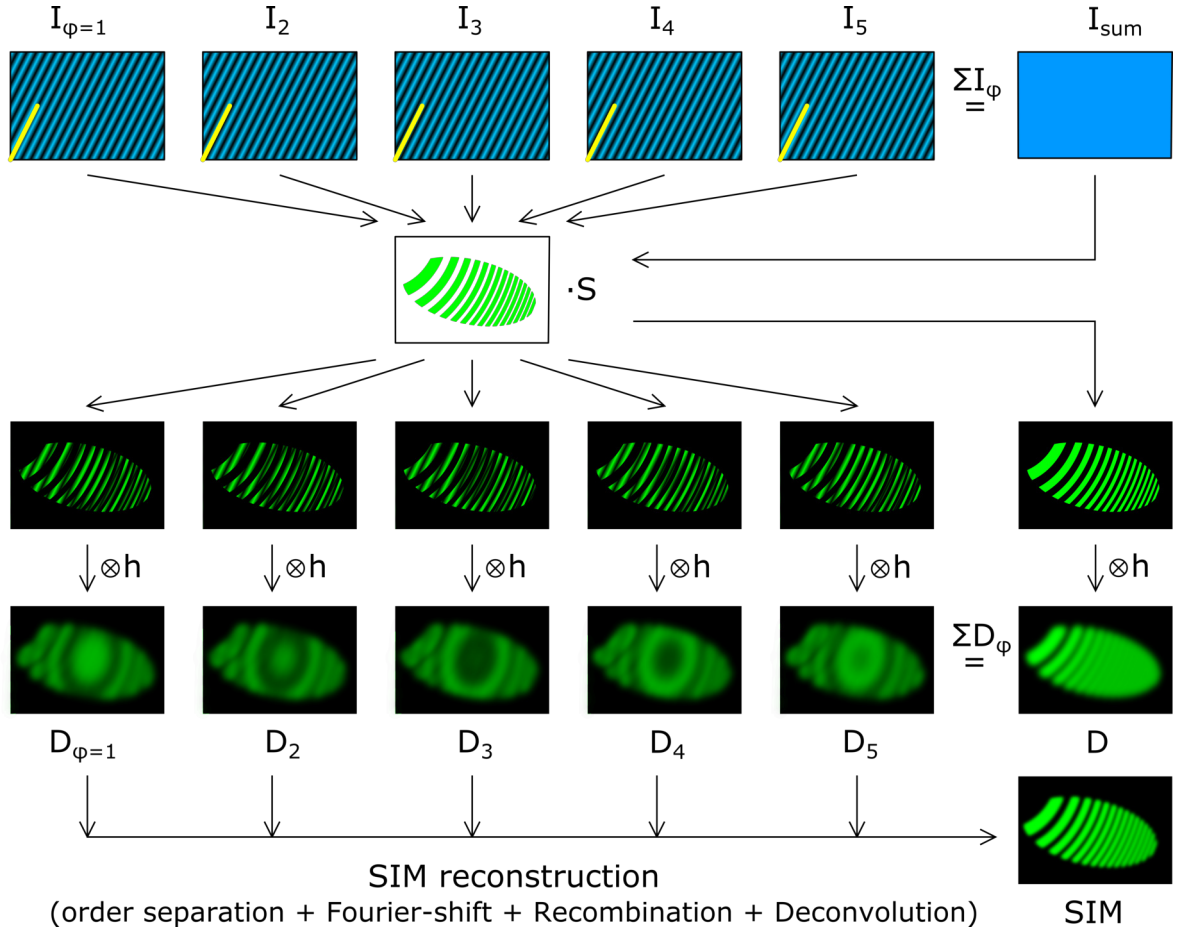


Abbildung A.2: Zur Separation der 5 SIM-Ordnungen sind 5 (lateral) verschobene Beleuchtungsmuster I mit Phase ϕ notwendig (erste Zeile). Die Verschiebung der einzelnen Beleuchtungsmuster ist durch die gelbe Referenzlinie sichtbar. Die Verschiebung ist äquidistant, sodass die Summe aller Beleuchtungsmuster einer homogenen Weitfeldbeleuchtung entspricht (rechte Spalte). Das emittierte Licht von der Fluorophorverteilung (zweite Zeile) zeigt den Moiré Effekt (dritte Zeile). Die Abbildung der Emission durch die PSF (h) zeigt den Interferenzeffekt im Bild I_{ϕ} (vierte Zeile). Im Vergleich zur Weitfeld Abbildung (rechte Spalte) erscheinen Interferenzstreifen, wo die Weitfeld Abbildung keinerlei Struktur auflösen kann. Es ist erkennbar, dass eine Verschiebung des Beleuchtungsmusters I_{ϕ} mit einer Veränderung des Interferenzmusters D_{ϕ} einhergeht (vierte Zeile). Diese Veränderung im Realraum ist die im Fourierraum notwendige Phase mit der jede SIM-Ordnung moduliert ist und welche für die Separation der stets nur als Summe zu messenden SIM-Ordnungen unverzichtbar ist. Die SIM-Rekonstruktion (fünfte Zeile) zeigt eine deutlich höhere Auflösung als das Weitfeldbild D . Nachgedruckt mit Genehmigung aus [RF5], The Optical Society.

A.7. Ideale inverse mixing Matrix

$$\mathbf{M} = e^{i\phi_{m,n}} \quad (\text{A.21})$$

$$\mathbf{M}^{-1} = \frac{1}{m_{ges}} \cdot e^{-i\phi_{n,m}} \quad (\text{A.22})$$

Beweis der Inversen:

$$\mathbf{A} := \mathbf{M}^{-1} \mathbf{M} \quad (\text{A.23})$$

$$\begin{aligned} A_{m,n} &\stackrel{?}{=} \delta(m-n) \\ A_{m,n} &= \sum_{j=1}^{m_{ges}} M_{m,j}^{-1} M_{j,n} \\ &= \sum_{j=1}^{m_{ges}} \frac{1}{m_{ges}} \cdot e^{-i\phi_{m,j}} \cdot e^{i\phi_{j,n}} \\ &= \frac{1}{m_{ges}} \sum_{j=1}^{m_{ges}} e^{-i \cdot m \cdot j \cdot \phi_{schritt}} \cdot e^{i \cdot j \cdot n \cdot \phi_{schritt}} \\ A_{m,n} &= \frac{1}{m_{ges}} \sum_{j=1}^{m_{ges}} e^{-i \cdot j \cdot \frac{2\pi}{m_{ges}} \cdot (n-m)} \\ &= \delta(m-n) \end{aligned} \quad (\text{A.24})$$

A.8. Form von Bewegungsartefakten

Die Bewegungsartefakte $\Theta_{n'}$ aus Gl. 3.37 können umgeschrieben werden, indem man die Symmetrieeigenschaften der Ordnung aus Abschnitt 3.2.6 berücksichtigt:

$$\begin{aligned}\Theta_{n'}(\vec{r}) &= \sum_m M_{n'm}^{-1} \sum_n M_{mn} L_n \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \\ &= \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[M_{m0} L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right] (\vec{r}) + \sum_{n>0} \left[M_{mn} L_n \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + M_{m,-n} L_{-n} \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{-i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right] \right]\end{aligned}\tag{A.25}$$

Verwendung von $L_n = L_{-n}$, $h_n = h_{-n}$ und $M_{m,\pm n} = e^{i(\pm mn\phi_{\text{schritt}} + \phi_0)}$

$$\begin{aligned}&= \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[e^{i\phi_0} L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right] (\vec{r}) + \sum_{n>0} L_n e^{i\phi_0} \left[e^{imn\phi_{\text{schritt}}} \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + e^{-imn\phi_{\text{schritt}}} \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{-i\vec{r}\vec{k}_n} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right] \right] \\ &= e^{i\phi_0} \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right] (\vec{r}) + \sum_{n>0} L_n \left[\left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{i(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}})} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + \cdot \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot e^{-i(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}})} \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right] \right] \\ &= e^{i\phi_0} \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right] (\vec{r}) \right. \\ &\quad \left. + \sum_{n>0} L_n \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot \left(e^{i(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}})} + e^{-i(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}})} \right) \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right] \\ &= e^{i\phi_0} \sum_m M_{n'm}^{-1} \left[L_0 \left[\varrho_m^\delta \otimes h_0 \right] (\vec{r}) \right. \\ &\quad \left. + 2 \sum_{n>0} L_n \left[\left(\varrho_m^\delta \cdot \cos(\vec{r}\vec{k}_n + mn\phi_{\text{schritt}}) \right) \otimes h_n \right] (\vec{r}) \right]\end{aligned}\tag{A.26}$$

A.9. SNR der normalisierten z-scores in Abhängigkeit von der Photonenanzahl

Photons N	n_{floor}^{ult}	$\sigma(n_{floor}^{ult})$	$z_{norm}^{ult}@STV$	$SNR^{STV} = \frac{z_{norm}^{ult} - n_{floor}^{ult}}{\sigma(n_{floor}^{ult})}$	$z_{norm}^{ult}@DTV$	SNR^{DTV}
100.000	0,013	0,0009	0,085	80	0,87	956
10.000	0,042	0,0028	0,084	15	0,88	295
1.000	0,13	0,009	0,16	2,9	0,89	84
100	0,42	0,028	0,38	1,3	0,93	18

Tabelle 4: Wie in Abschnitt 7.3 dargestellt ist der normalisierte z-score zwar unabhängig von der Anzahl gemessener Photonen - das Rauschen ist es aber nicht. Folglich ist das SNR ebenfalls abhängig von der Anzahl an Photonen. Um die Qualität der folgenden Schwellwertbildung und Klassifikation sicherzustellen ist jedoch ein SNR von mindestens 5,64 notwendig. Die Tabelle zeigt, wie sich der Hintergrund n_{floor}^{ult} , dessen Rauschen $\sigma(n_{floor}^{ult})$ und das Signal der Bildverarbeitung z_{norm}^{ult} an den Schwellwerten von Scherung (STV (Shearing-Threshold-Velocity)) und Verformung (DTV (Distortion-Threshold-Velocity)) für verschiedene Anzahl an Photonen N verhalten. Das zugehörige SNR an den Schwellwerten $SNR^{STV/DTV}$ ist ebenso dargestellt. Das Rauschen sinkt mit steigender Photonenanzahl, sodass auf helle Objekte der Schwellwert mit höherer Konfidenz angewandt werden kann. Zudem hat die Schwellwertbildung für eine Verformung eine deutlich höhere Güte, als die Schwellwertbildung einer Scherung. Daraus folgt, dass eine Verformung auch bei dunkleren Objekten festgestellt werden kann, während eine Scherung relativ viele Photonen (über 1000) benötigt.

A.10. Klassifizierung experimenteller Daten

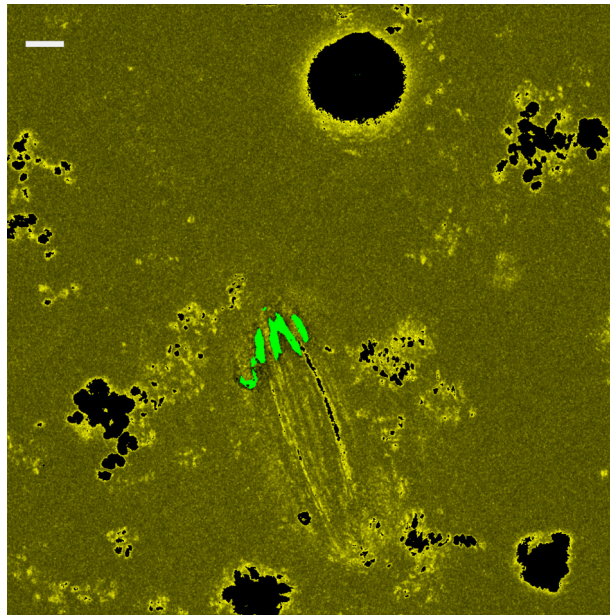


Abbildung A.3: Trustmap einer einzelnen Schicht mit Fokus auf den freien Chloroplasten. Die Aufnahme zeigt nur wenige stationäre (grüne) Bereiche und hat erhebliche schwarze Bereiche in denen der Aufnahme kein Vertrauen (trust) geschenkt werden kann. (gelb = Rauschen; Balken oben links = $5\mu\text{m}$)

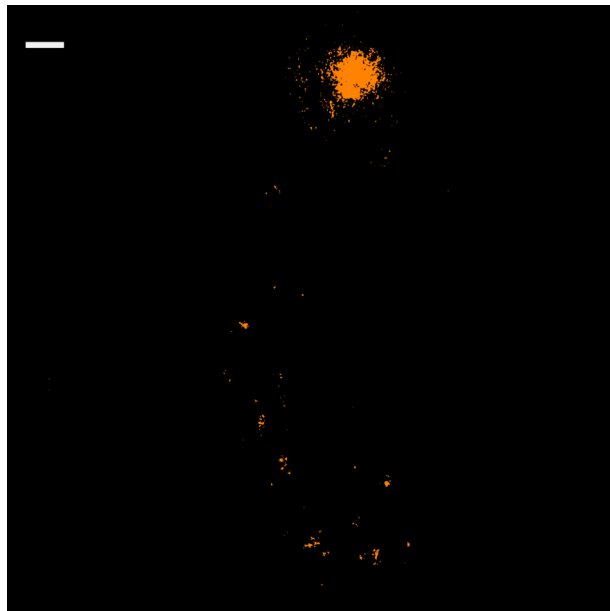


Abbildung A.4: Artefactmap einer einzelnen Schicht mit Fokus auf die fixierte Spaltzelle. Die Aufnahme zeigt geringe Artefakte bei der Aufnahme des freien Chloroplasten. Die SIM-Aufnahme des Spaltzelle zeigt keine Artefakte und kann ohne Bedenken verwendet werden. (orange = Scherung; Balken oben links = $5\mu\text{m}$)

Literatur

- [1] E. Abbe, “Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung,” *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, vol. 9, no. 1, pp. 413–418, 1873.
- [2] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3 Atome, Moleküle und Festkörper*. Springer, 3 ed., 2005.
- [3] Max Knoll und Ernst Ruska, “Das Elektronenmikroskop,” *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, vol. 87, no. 5-6, pp. 318–339, 1932.
- [4] R. Erni, M. D. Rossell, C. Kisielowski, and U. Dahmen, “Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe,” *Physical Review Letters*, vol. 102, no. 9, pp. 1–4, 2009.
- [5] U. K. Felix Börrnert, Johannes Biskupek, Zhongbo Lee, Martin Linck, Peter Hartel, Heiko Müller, Maximilian Haider, “Engineering the Contrast Transfer through the Cc/Cs Corrected 20-80 kV SALVE Microscope,” *European Microscopy Congress 2016: Proceedings*, pp. 567–568, 2016.
- [6] N. De Jonge and D. B. Peckys, “Live Cell Electron Microscopy Is Probably Impossible,” *ACS Nano*, vol. 10, no. 10, pp. 9061–9063, 2016.
- [7] T. Zheng, K. W. Waldron, and A. M. Donald, “Investigation of viability of plant tissue in the environmental scanning electron microscopy,” *Planta*, vol. 230, no. 6, pp. 1105–1113, 2009.
- [8] J. E. McGregor, L. T. L. Staniewicz, S. E. Guthrie, and A. M. Donald, “Environmental Scanning Electron Microscopy in Cell Biology,” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 493–516, 2012.
- [9] F. Zernike, “Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II,” *Physica*, vol. 9, no. 10, pp. 974–986, 1942.
- [10] M. G. Nomarski, “Interferential polarizing device for study of phase objects,” *US Pat. No. 2924142*, 1960.
- [11] W. J. Schmidt, “Doppelbrechung der Kernspindel und Zugfasertheorie der Chromosomenbewegung,” *Chromosoma*, vol. 1, no. 1, pp. 253–264, 1939.
- [12] W. Richardson, “Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 62, no. I, pp. 55–59, 1972.

-
- [13] L. B. Lucy, "An iterative technique for the rectification of observed distributions," *The Astronomical Journal*, vol. 79, no. 6, pp. 745–749, 1974.
- [14] D. a. Agard and J. W. Sedat, "Three-dimensional architecture of a polytene nucleus.," *Nature*, vol. 302, no. 5910, pp. 676–681, 1983.
- [15] S. D. Strasser, G. Shekhawat, J. D. Rogers, V. P. Dravid, A. Tafflove, and V. Backman, "Near-field penetrating optical microscopy: a live cell nanoscale refractive index measurement technique for quantification of internal macromolecular density.," *Optics letters*, vol. 80, no. 4, pp. 631–637, 2012.
- [16] K. A. Lidke, B. Rieger, T. M. Jovin, and R. Heintzmann, "Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics," *Optics Express*, vol. 13, no. 18, pp. 7052–7062, 2005.
- [17] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution," *Science*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642–1645, 2006.
- [18] M. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) provides sub-diffraction-limit image resolution," *Nat. Methods*, vol. 3, no. 10, pp. 793–795, 2006.
- [19] S. Cox, E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D. T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G. E. Jones, and R. Heintzmann, "Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics," *Nature Methods*, vol. 9, no. 2, pp. 195–200, 2012.
- [20] J. Mertz, *Introduction to Optical Microscopy*. Roberts and Company Publisher, 2010.
- [21] M. Marvin, "Microscopy Appartatus, U.S. patent 3,013,467," 1957.
- [22] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 15, pp. 8206–8210, 2000.
- [23] F. Balzarotti, Y. Eilers, K. C. Gwosch, A. H. Gynnå, V. Westphal, F. D. Stefani, J. Elf, and S. W. Hell, "Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes," *Science*, vol. 355, no. February, pp. 606–612, 2017.

-
- [24] S. J. Sahl, F. Balzarotti, J. Keller-Findeisen, M. Leutenegger, V. Westphal, A. Egner, F. Lavoie-Cardinal, A. Chmyrov, T. Grotjohann, and S. Jakobs, "Comment on 'extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics'," *Science*, vol. 352, no. 6285, p. 527, 2016.
- [25] R. Heintzmann and C. G. Cremer, "Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating," in *Proc.SPIE 3568, Optical Biopses and Microscopic Techniques III*, no. 185, pp. 185–196, 1999.
- [26] M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 198, no. 2, pp. 82–87, 2000.
- [27] Z. Liu, L. D. Lavis, and E. Betzig, "Imaging live-cell dynamics and structure at the single-molecule level," *Molecular Cell*, vol. 58, no. 4, p. 644, 2015.
- [28] R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer, "Saturated patterned excitation microscopy - a concept for optical resolution improvement," *Journal of the Optical Society of America A*, vol. 19, no. 8, p. 1599, 2002.
- [29] E. H. Rego, L. Shao, J. J. Macklin, L. Winoto, G. A. Johansson, N. Kamps-Hughes, M. W. Davidson, and M. G. L. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 3, pp. E135–43, 2012.
- [30] H. Stöcker, *Taschenbuch der Physik*. Verlag Harri Deutsch, 2007.
- [31] S. Wäldchen, J. Lehmann, T. Klein, S. van de Linde, and M. Sauer, "Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 15348, 2015.
- [32] D. Li and E. Betzig, "Response to comment on extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics," *Science*, vol. 352, no. 6285, p. 527, 2016.
- [33] L. Shao, P. Kner, E. H. Rego, and M. G. L. Gustafsson, "Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination," *Nature Methods*, vol. 8, no. 12, pp. 1044–1046, 2011.

-
- [34] L. M. Hirvonen, K. Wicker, O. Mandula, and R. Heintzmann, “Structured illumination microscopy of a living cell,” *European Biophysics Journal*, vol. 38, no. 6, pp. 807–812, 2009.
 - [35] P. Kner, B. B. Chhun, E. R. Griffis, L. Winoto, and M. G. L. Gustafsson, “Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination,” *Nature methods*, vol. 6, no. 5, pp. 339–42, 2009.
 - [36] K. Wicker and R. Heintzmann, “Single-shot optical sectioning using polarization-coded structured illumination,” *Journal of Optics*, vol. 12, no. 8, p. 084010, 2010.
 - [37] R. Milo and R. Phillips, *Cell Biology By the Numbers*. Taylor & Francis Ltd., 2014.
 - [38] GE Healthcare, “DeltaVision OMX SR super-resolution microscope,” 2015.
 - [39] Productinformation, “ZEISS ELYRA Your Flexible Imaging System for 3D Super-resolution Microscopy,” 2013.
 - [40] R. Fiolka, L. Shao, E. H. Rego, M. W. Davidson, and M. G. L. Gustafsson, “Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination,” *PNAS*, vol. 109, no. 14, pp. 5311–5315, 2012.
 - [41] F. Ströhl and C. F. Kaminski, “Speed limits of structured illumination microscopy,” *Optics Letters*, vol. 42, no. 13, pp. 2511–2514, 2017.
 - [42] F. Jünger, P. v. Olshausen, and A. Rohrbach, “Fast, label-free super-resolution live-cell imaging using rotating coherent scattering (ROCS) microscopy,” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 30393, 2016.
 - [43] DFG, *Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis*. Wiley-VCH, 2013.
 - [44] D. Li, L. Shao, B.-C. Chen, X. Zhang, M. Zhang, B. Moses, D. E. Milkie, J. R. Beach, J. A. Hammer, M. Pasham, T. Kirchhausen, M. A. Baird, M. W. Davidson, P. Xu, and E. Betzig, “Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics,” *Science*, vol. 349, no. 6251, p. aab3500, 2015.
 - [45] J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, and S. H. Heinemann, *Handbook of Biophotonics, Volume 1: Basics and Techniques*. Wiley-VCH, 2011.

-
- [46] J. Strömqvist, A. Chmyrov, S. Johansson, A. Andersson, L. Mäler, and J. Widdengren, “Quenching of triplet state fluorophores for studying diffusion-mediated reactions in lipid membranes,” *Biophysical Journal*, vol. 99, no. 11, pp. 3821–3830, 2010.
- [47] K. Wicker, *Increasing resolution and light efficiency in fluorescence microscopy*. PhD thesis, King’s College London, 2010.
- [48] B. E. A. Saleh and M. C. Teich, *Fundamentals of Photonics*. Wiley Interscience, 2007.
- [49] J. W. Goodman and J. W., *Introduction to Fourier optics*. McGraw-Hill, 1996.
- [50] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol, and H. Mühlig, *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, 2006.
- [51] P. P. Ewald, “Introduction to the dynamical theory of X-ray diffraction,” *Acta Crystallographica Section A: Crystal Physics, Diffraction, Theoretical and General Crystallography*, vol. 25, no. 1, pp. 103–108, 1969.
- [52] R. Förster, “Fast Structured Illumination Microscopy,” *Master Thesis, Physikalisch-Astronomische Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena*, 2012.
- [53] H. Gross, W. Singer, and M. Totzeck, *Handbook of Optical Systems - Physical Image Formation*. Wiley-VCH, 2005.
- [54] H. Gross, W. Singer, and M. Totzeck, *Handbook of Optical Systems - Aberration-Theory and Correction of Optical Systems*. Wiley-VCH, 2006.
- [55] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital Image Processing*. Pearson Education, 2nd editio ed., 2002.
- [56] G. de Villiers and E. R. Pike, *The Limits of Resolution*. CRC Press, 2016.
- [57] L. Mandel and E. Wolf, *Optical Coherence and Quantum Optics*, vol. 64. Cambridge University Press, New York, 1995.
- [58] B. Gao, S. Gao, Y. Zhong, and C. Gu, “Random weighting estimation of sampling distributions via importance resampling,” *Communications in Statistics: Simulation and Computation*, vol. 46, no. 1, pp. 640–654, 2017.

-
- [59] A. A. Alzaid and M. A. Omair, “On the Poisson difference distribution inference and applications,” *Bulletin of the Malaysian Mathematical Sciences Society*, vol. 33, no. 1, pp. 17–45, 2010.
- [60] D. Rasch, *Einführung in die mathematische Statistik*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1976.
- [61] R. L. Lucke, “Fourier-space properties of photon-limited noise in focal plane array data, calculated with the discrete Fourier transform,” *Journal of the Optical Society of America*, vol. 18, no. 4, pp. 777–790, 2001.
- [62] M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat, “Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination,” *Biophysical journal*, vol. 94, no. 12, pp. 4957–4970, 2008.
- [63] W. Lukosz and M. Marchand, “Optischen Abbildung Unter Überschreitung der Beugungsbedingten Auflösungsgrenze,” *Optica Acta: International Journal of Optics*, vol. 10, no. 3, pp. 241–255, 1963.
- [64] R. Penrose and J. A. Todd, “A generalized inverse for matrices,” *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 51, no. 03, p. 406, 1955.
- [65] K. Wicker, O. Mandula, G. Best, R. Fiolka, and R. Heintzmann, “Phase optimisation for structured illumination microscopy,” *Optics Express*, vol. 21, no. 2, p. 2032, 2013.
- [66] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA, 2006.
- [67] Hamamatsu, “ORCA-flash4.0 v2,” 2015.
- [68] I. Rumak, R. Mazur, K. Gieczewska, J. Koziol-Lipińska, B. Kierdaszuk, W. P. Michalski, B. J. Shiell, J. H. Venema, W. J. Vredenberg, A. Mostowska, and M. Garstka, “Correlation between spatial (3D) structure of pea and bean thylakoid membranes and arrangement of chlorophyll-protein complexes,” *BMC plant biology*, vol. 12, p. 72, 2012.
- [69] P. E. Anuta, “Spatial registration of multispectral and multitemporal digital imagery using fast Fourier transform techniques,” *IEEE Transactions on Geoscience Electronics*, vol. 8, no. 4, pp. 353–368, 1970.
- [70] C. Kittel and H. Kroemer, *Thermal Physics*. W. H. Freeman, 1980.

Eigene Veröffentlichungen ([RF1 - RF5]) sind in Abschnitt B.2 separat aufgeführt.

B. Wissenschaftlicher Bildungsgang

B.1. Lebenslauf

Persönliche Informationen:

Name: Ronny Förster
 Geboren am: 11.02.1989
 Geboren in: Gera
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Berufserfahrung (Auswahl):

11/2016 - 03/2017 **Praktikant**, Forschungs- und Entwicklungsabteilung, Carl Zeiss AG, Jena
 seit 08/2014 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, AG Biomedizinische Bildgebung, Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V., Jena
 12/2012 - 04/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, AG Biomedizinische Bildgebung, Institut für Physikalisch Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
 08/2012 - 09/2012 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Randall Division of Cell & Molecular Biophysics, King's College, London, Vereinigtes Königreich
 08/2010 - 09/2010 **Studentische Hilfskraft**, Institut für Kernphysik im Kernforschungszentrum der Al-Farabi University, Almaty, Kasachstan

Ausbildung:

seit 08/2014 **Promotion**, Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
 10/2010 - 12/2012 **Studium der Physik (M.Sc.)**, Physikalisch-Astronomische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
 10/2007 - 09/2010 **Studium der Physik (B.Sc.)**, Physikalisch-Astronomische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
 06/2007 **Abitur**, Carl-Zeiss-Gymnasium Jena

Jena, den 17. September 2018

Ronny Förster

B.2. Publikation

- [RF1] D. Weigel, **R. Förster**, H. Babovsky, A. Kiessling, R. Kowarschik: „Enhanced resolution of microscopic objects by image inversion interferometry“; *Optics express*; **2011**
- [RF2] **R. Förster**, H.-W. Lu-Walther, A. Jost, M. Kielhorn, K. Wicker, R. Heintzmann: „Simple structured illumination microscope setup with high acquisition speed by using a spatial light modulator“; *Optics express*; **2014**
- [RF3] H.-W. Lu-Walther, M. Kielhorn, **R. Förster**, A. Jost, K. Wicker, R. Heintzmann: „fastSIM: a practical implementation of fast structured illumination microscopy“; *Methods and Applications in Fluorescence*; **2015**
- [RF4] L. Song, H.-W. Lu-Walther, **R. Förster**, A. Jost, M. Kielhorn, J. Zhou, R. Heintzmann: „Fast structured illumination microscopy using rolling shutter cameras“; *Measurement Science and Technology*; **2016**
- [RF5] **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller, A. Jost, R. Heintzmann: „Motion artefact detection in structured illumination microscopy for live cell imaging“; *Optics Express*; **2016**

B.3. Patentanmeldung

1. R. Heintzmann, A. Jost, **R. Förster**, M. Kielhorn, T. Hoffmann, M. Lehr, L. Elsmann, K. Wicker, M. Wald, H.-J. Dobschal: „Optische Anordnung und Verfahren zu deren Betrieb in zwei Betriebsarten“; Deutsches Patent DE102016211743; **2017**

B.4. Liste von Postern

1. **R. Förster**, H.-W. Lu-Walther, L. Song, M. Kielhorn, R. Heintzmann „Fast High-Resolution Fluorescence Microscopy by Structured Illumination“ IONS, Karlsruhe, Germany; **2015**
2. **R. Förster**, H.-W. Lu-Walther, L. Song, M. Kielhorn, R. Heintzmann „Fast High-Resolution Fluorescence Microscopy by Structured Illumination“ Winterseminar, Klosters, Switzerland; **2015**

B.5. Liste von Vorträgen

Konferenzen

1. **R. Förster**, A. Jost, M. Kielhorn, H.-W. Lu-Walther and R. Heintzmann „Fast structured illumination microscopy based on spatial light modulator“ Winterseminar, Klosters, Switzerland; **2016**
2. **R. Förster**, H.-W. Lu-Walther, A. Jost, M. Kielhorn, K. Wicker and R. Heintzmann „Fast Structured Illumination Microscope with a Minimum of Synchronization “ Focus on Microscopy, Taipei, Taiwan; **2016**
3. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Image-based Systems Biology, Jena, Germany; **2016**
4. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Frontiers in Optics, Rochester, USA; **2016**
5. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Focus on Microscopy, Bordeaux, France; **2017**
6. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Winterseminar, Klosters, Switzerland; **2018**

Externe (Gruppen-) Seminare

7. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Lunch and Learn, Harvard Cambridge, USA; **2016**
8. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ Group seminar So-Lab, MIT Cambridge, USA; **2016**
9. **R. Förster**, K. Wicker, W. Müller and R. Heintzmann „Motion Artefact Detection in Structured Illumination Microscopy“ PhD-seminar, Dornburg, Germany; **2018**

B.6. Genehmigung Teile von [RF2] und [RF5] in dieser Arbeit zu verwenden:

„Dear Ronny Förster,
[...]

For the use of material from [1] Ronny Förster, Kai Wicker, Walter Müller, Aurélie Jost, and Rainer Heintzmann, „Motion artefact detection in structured illumination microscopy for live cell imaging, “Opt. Express 24, 22121-22134 (2016) and [3] Ronny Förster, Hui-Wen Lu-Walther, Aurélie Jost, Martin Kielhorn, Kai Wicker, and Rainer Heintzmann, „Simple structured illumination microscope setup with high acquisition speed by using a spatial light modulator, “Opt. Express 22, 20663-20677 (2014):

As long as the copyrighted material is included within the body, section or chapter, of the thesis, and is not posted separate from the thesis, OSA considers your requested use of its copyrighted materials to be permissible within the author rights granted in the Copyright Transfer Agreement submitted by the requester on acceptance for publication of his/her manuscript. It is requested that the Author Accepted (or pre-print) version be the version included within the thesis and that a complete citation of the original material be included in any publication. This permission assumes that the material was not reproduced from another source when published in the original publication.

[...]

Rebecca Robinson

September 18, 2017

Authorized Agent, The Optical Society “

C. Danksagung

Zum Entstehen dieser Arbeit haben sehr viele Leute auf sehr verschiedene Art und Weise beigetragen, wofür ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken möchte.

Als erstes gilt mein Dank natürlich Prof. Dr. Rainer Heintzmann für die Betreuung meiner Arbeit und die zahlreichen geduldigen Diskussionen über die Theorie von Mikroskopen, deren praktische Umsetzung und deren Bildverarbeitung. Ich bin sehr froh, dass ich meinen Tag unabhängig gestalten konnte und frei entscheiden konnte, welchen Themen ich mich widme. Von großem Wert war für mich insbesondere die langfristige Finanzierung. Durch diese Planungssicherheit konnte ich mich voll auf meine Arbeit konzentrieren. Im Rahmen meiner Promotion durfte ich an einer Vielzahl (nicht ganz günstiger) Konferenzen teilnehmen, meine Projekte vorstellen und Kontakte knüpfen. Rückblickend denke ich, dass mir in den letzten Jahren alle Möglichkeiten gegeben wurden, um ein großartiges Fundament für meinen weiteren Werdegang zu bauen.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus auch bei Prof. Dr. Volker Deckert für die Begutachtung dieser Monographie und die dafür aufgewendete Zeit und Mühe.

Mein Dank gilt auch dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Verein Deutscher Ingenieure für die Finanzierung des 2-Jahresprojekts FastFibreSIM, aus dem schlussendlich diese Monographie entstanden ist.

Dr. Martin Kielhorn möchte ich danken, als großartigen Ansprechpartner zu Beginn meiner Promotion, sowie für die vielen Ideen bezüglich „Reverse Engineering“. Die Fähigkeit, ein kommerzielles Gerät aus seiner Komfortzone heraus zu holen und dadurch noch leistungsfähiger zu machen, hilft mir jeden Tag.

Bei Dr. Walter Müller muss ich mich fast Entschuldigen dafür, dass ich täglich sein Büro stürmen durfte, um ihn von einer neuen „ganz großartigen“ Idee zu erzählen. Die darauffolgende Diskussion über verschiedenste Themen empfinde ich als unglaublich wertvoll und ich bin davon überzeugt, dass wir dabei irgendwann auch tatsächlich mal auf eine großartige Idee stoßen werden. Zusätzlich möchte ich mich bedanken für das Lesen und Korrigieren von Manuskripten, wie diesen.

Dr. Christian Karras danke ich für die Aufnahme und Rekonstruktion von Daten am FastSIM System. Die Qualität einer Bildverarbeitung hängt unmittelbar mit der Qualität der Rohdaten zusammen. Christians unermüdlicher Willen und Einsatz bis die Rohdaten perfekt sind, erleichtert mir deren Auswertung erheblich.

Durch ein Gespräch mit Martin Reifarh kam die Idee autofluoreszente Zellen zu verwenden, sodass ich mir das komplexe Züchten und Labeln von Zellen sparen konnte. Die anschließende Bildgebung von Blättern herkömmlichen Pflanzen erwies sich als großartig.

Simon Labouesse erklärte mir den neuen Algorithmus für die SIM-Rekonstruktion, der die Basis für meine Simulationen darstellt. Seine zahlreichen Kommentare und Dokumente haben mir den Einstieg in mein Promotionsthema erheblich vereinfacht.

Dr. Tobias Habisreuther und Torsten Wieduwilt gaben mir die Möglichkeit am experimentellen Teil des FastFibreSIM-Projektes mitzuarbeiten. Ich möchte mich bedanken, für die Hilfe im Umgang mit optischen Fasern, sowie das Schreiben von Berichten für das BMBF.

Mein 4-monatiges Praktikum bei der Firma Zeiss hat mir nicht nur viel Freude bereitet, sondern zugleich einen sehr wertvollen Blick über den Tellerrand der Universität geschenkt. Für die sehr konstruktive Arbeit im Labor am FastFibreSIM-Prototypen möchte ich mich bei Dr. Gerhard Krampert und Dr. Ralf Netz bedanken. Dr. Kai Wicker gab mir sehr wertvolle Vorschläge für die Bildverarbeitung. Seine Idee, das Differenzbild noch einmal mit der PSF zu falten, erhöht das SNR maßgeblich und ermöglicht erst die nachfolgende Klassifizierung.

Im Rahmen des FastFibreSIM Projektes möchte ich auch die Anregungen von Dr. Martin Thomas hervorheben.

Tim Carlsen möchte ich als Freund und für das Lesen einiger Teile dieser Arbeit danken. Das gleichzeitige Schreiben an unseren Monographien hat mich sehr motiviert. Es war gut zu wissen, dass ich auch an einem Samstagabend nicht der Einzige bin, der gerade mit (dem Schreiben) seiner Dissertation sein Wochenende verbringt.

Dr. Tobias Wagner und Linda Klaus gebührt Dank für das leidenschaftliche Erklären biologischer Mechanismen in der Zellbiologie. Tobias möchte ich darüber hinaus sehr Danken für die externe Hilfestellung und das offene Ohr bei organisatorischen Problemen.

Robert Kretschmer möchte ich als Bürokollege für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre danken, sowie für die leckeren Köstlichkeiten die er stets bereit war, zu teilen und die Möglichkeit auch mal seinen Frust kund zu tun.

Dr. Aurelié Jost danke ich für das zahlreiche und detaillierte Lesen von Manuskripten.

Für die zahlreichen Diskussionen über Wissenschaft und andere Dinge, sowie das gegenseitige Helfen möchte ich mich bei Jan Becker, Benedict Diederich, Dr. Norik Janunts, Alexander Jügler, Barbora Marsikova, Sergey Nazarov, Dr. Stephan Roth, Dr. Patrick Then, Alejandra Zegarra und insbesondere Alexander '*dem Studenten*' Knauss bedanken.

Ich möchte mich bei der OSA (The Optical Society) für die Finanzierung eines Workshops und einer Konferenzteilnahme in den USA bedanken. Dies war nur möglich, durch das langjährige Engagement von Prof. Dr. Herbert Stafast, als betreuenden Hochschullehrer des OSA Student Chapters. Die drei darauffolgenden Einladungen für Vorträge und Laborführungen nach Harvard, an das MIT und die Boston University haben mir einen atemberaubenden Einblick in US-amerikanische Spitzenforschung gegeben. Für diese einzigartige Möglichkeit, das Feedback bzgl. meiner Forschung und den überaus freundlichen Empfang möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter So, Dr. Douglas Richardson und Prof. Dr. Jerome Mertz bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern am IPHT und IPC. Die Organisation um die Forschung herum ist herausragend. Buchhaltung, Projektmanagement und Infrastruktur sind hervorragend und dafür möchte ich mich insbesondere bei Dr. Ivonne Bieber sowie Antje Raabe, Frau Schäfer und Frau Göbel bedanken.

Außerhalb der Arbeitszeiten haben viele Leute mit einem offenen Ohr oder auch durch gezieltes Ablenken zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich insbesondere bei - Till Drewas, Steven '*Bob*' Fleming, Dr. Thomas Gallert, Diana Kalden, JuliBert, Oliver Melior, Matthias Münnich, David Purmann, und Tilman Wilhelm - bedanken.

René, dir möchte ich für Alles danken, was in den letzten Jahren passiert ist. Ich bin unglaublich glücklich, dass unsere Freundschaft so stark ist, dass obwohl wir täglich als Kollegen nebeneinandersitzen und uns ertragen müssen, wir trotzdem noch 5 Wochen zu zweit im Regen Neuseelands Zelten gehen.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die moralische Unterstützung Bedanken. Ihr habt mir nie einen Vorwurf gemacht, dass ich trotz des kurzen Heimweges viel zu selten zu Hause bin. Ihr unterstützt mich immer in dem was ich tue und sagt vor allem, wenn ihr von etwas nicht überzeugt seid. Auch wenn ihr mal die Polizei ruft, wenn ich mal

ein paar Tage nicht anrufe, bin ich sehr dankbar dafür, dass ich euch habe. Ihr seid immer super stolz auf mich und das, was ich tue - „mit Mikroskopen und Licht und Lasern, am Computer und das auch noch auf Englisch“.

Maria, ich bin überglücklich, dass ich dich habe und freue mich über alles was war und auf alles was noch kommt. Seit sechs Wochen weiß ich nun, dass ich Papa werde, aber habe immer noch keine Ahnung, was das eigentlich genau bedeutet. Ich freue mich aber auf jenen sehr fernen Tag an dem, aus Interesse oder purer Langeweile, der Nachwuchs in Papas Doktorarbeit rumblättert und genau hier erfährt, dass sein aktueller Name, an diesem kalten Februartag, noch in den Sternen steht und aktuell nur vom „Hamster“ gesprochen wird.

Jena, den 28. Februar 2018

D. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 17. September 2018

Ronny Förster